

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Stellenwert der Elemente des PI3K/ mTOR/ AKT Signalweges als Biomarker beim
Peniskarzinom

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Sascha Reetz
aus Böblingen

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

06. Dezember 2022

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	1
Abbildungsverzeichnis.....	2
Tabellenverzeichnis.....	3
Hintergrund.....	4
Peniskarzinom.....	4
mTOR Signalweg.....	8
Methoden.....	12
Klinische Daten.....	12
Tissue Microarray (TMA) und immunhistochemische Färbung.....	14
IRS – Score.....	21
HPV Analyse.....	21
p16 ^{INK4a} Färbung.....	21
Statistische Analyse.....	22
Ergebnisse.....	24
Biomarkerauswertung.....	26
Korrelation der Biomarker mit den klinischen Daten.....	28
Univariate Überlebensanalyse.....	35
panAkt.....	38
P4EBP1.....	40
pmTOR.....	43
Multivariate Überlebensanalyse.....	44
Diskussion.....	46
Zusammenfassung.....	51
Limitationen.....	51
Bemerkung.....	51
Literaturverzeichnis.....	52
Lebenslauf.....	57

Abkürzungsverzeichnis

VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor
HER	Human epidermal growth factor receptor
IGF-1	Insulin-like Growth-Factor 1
Raptor	Regulatory Associated Protein of mTOR
mLST8	Mammalian LST8/G-protein
PRAS40	Proline-rich Akt Substrate
4EBP1	Eukaryotischer Initiationsfaktor-4E-Bindungsprotein
pp70S6K1	Phospho-p70 S6 Kinase 1
FCS	Fetales Kälberserum
S6K1	Protein S6 Kinase 1
Rictor	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
DSS	Krankheitsspezifisches Überleben (disease-specific survival)
OS	Gesamtüberleben (overall survival)
RFS	rezidivfreies Überleben (recurrence-free survival)
MFS	metastasenfreies Überleben (metastasis-free survival)
Abb.	Abbildung
5-FU	5-Flourouracil

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1 PI3K/ mTOR/ AKT Signalweg</i>	10
<i>Abb. 2 Beispiel Intensität panAkt: Intensität 0</i>	17
<i>Abbildung 3 Beispiel Intensität panAkt: Intensität 1</i>	18
<i>Abb. 4 Beispiel Intensität panAkt: Intensität 2</i>	19
<i>Abb. 5 Beispiel Intensität panAkt: Intensität 3</i>	20
<i>Abb. 6 Beispiel immunhistochemische Färbung p16INK4a</i>	22
<i>Abb. 7 Korrelogramm der Biomarker</i>	28
<i>Abb. 8 Korrelation der Expression von panAkt mit klinischen und histologischen Parametern</i>	29
<i>Abb. 9 Korrelation der Expression von pmTOR mit klinischen und histologischen Parametern</i>	30
<i>Abb. 10 Korrelation der Expression von pPRAS mit klinischen und histologischen Parametern</i>	31
<i>Abb. 11 Korrelation der Expression von mTOR mit klinischen und histologischen Parametern</i>	32
<i>Abb. 12 Korrelation der Expression von pAkt mit klinischen und histologischen Parametern</i>	32
<i>Abb. 13 Korrelation der Expression von pS6 mit klinischen und histopathologischen Parametern</i>	33
<i>Abb. 14 Korrelation der Expression von p4EBP1 mit klinischen und histopathologischen Parametern</i>	33
<i>Abb. 15 Korrelation der Expression von pp70S6K mit klinischen und histopathologischen Parametern</i>	34
<i>Abb. 16 Korrelation der Expression von S6K1 mit klinischen und histopathologischen Parametern</i>	34
<i>Abb. 17 Zusammenhang zwischen Lymphknotenmetastasen und dem krankheitsspezifischen Überleben in der Kaplan-Meier Überlebenskurve (univariat).</i>	35
<i>Abb. 18 Zusammenhang zwischen der Expression von panAkt und dem Gesamtüberleben in der Kaplan-Meier Überlebenskurve (univariat).</i>	38
<i>Abb. 19 Zusammenhang zwischen der Expression von panAkt und dem krankheitsspezifischen Überleben in der Kaplan-Meier Überlebenskurve (univariat).</i>	39

<i>Abb. 20 Zusammenhang zwischen der Expression von panAkt und dem metastasenfremen Überleben in der Kaplan-Meier Überlebenskurve (univariat).....</i>	<i>39</i>
<i>Abb. 21 Zusammenhang zwischen der Expression von panAkt und dem rezidivfreien Überleben in der Kaplan-Meier Überlebenskurve (univariat).</i>	<i>40</i>
<i>Abb. 22 Zusammenhang zwischen der Expression von p4EBP1 und dem krankheitsspezifischen Überleben in der Kaplan-Meier Überlebenskurve (univariat).</i>	<i>41</i>
<i>Abb. 23 Zusammenhang zwischen der Expression von p4EBP1 und dem metastasenfremen Überleben in der Kaplan-Meier Überlebenskurve (univariat).....</i>	<i>41</i>
<i>Abb. 24 Zusammenhang der Expression von p4EBP1 und dem Gesamtüberleben in der Kaplan-Meier Überlebenskurve (univariat).</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 25 Zusammenhang zwischen der Expression von p4EBP1 und dem rezidivfreien Überleben in der Kaplan-Meier Überlebenskurve (univariat).....</i>	<i>42</i>
<i>Abb. 26 Zusammenhang der Expression von pmTOR und dem krankheitsspezifischen Überleben in der Kaplan-Meier Überlebenskurve (univariat).</i>	<i>43</i>

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1 TNM Klassifikation nach UICC.....</i>	<i>6</i>
<i>Tabelle 2 Antikörper</i>	<i>16</i>
<i>Tabelle 3 Auswertung klinische Daten.....</i>	<i>25</i>
<i>Tabelle 4 IRS Cut-off.....</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 5 Biomarker – Ergebnisse.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 6 Zusammenhang zwischen der Biomarkerexpression und dem Gesamtüberleben (Hazard Ratio der univariaten Cox-Regression).....</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 7 Zusammenhang zwischen der Biomarkerexpression und dem krankheitsspezifischen Überleben (Hazard Ratio der univariaten Cox-Regression).</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 8 Zusammenhang zwischen der Biomarkerexpression und dem rezidivfreien Überleben (Hazard Ratio der univariaten Cox-Regression).....</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 9 Zusammenhang zwischen der Biomarkerexpression und dem metastasenfremen Überleben (Hazard Ratio der univariaten Cox-Regression).</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 10 Multivariate Cox-Regression der Biomarkerexpression, klinischen und histopathologischen Parametern.</i>	<i>44</i>

Hintergrund

Das Peniskarzinom ist eine seltene und aggressive Tumorerkrankung des älteren Mannes (1). Dieser bösartige Tumor zeigt rasches Wachstum und frühe Metastasierung in die inguinalen Lymphbahnen (2). Die Prognose ist bei fortgeschrittenen Stadien häufig ungünstig. Zwar kann die Erkrankung im lokalen Stadium operativ geheilt werden, jedoch stehen für ein metastasiertes Krankheitsstadium bisher kaum wirksame Therapien zur Verfügung (3). Bei Versagen der Erstlinientherapie liegt das Gesamtüberleben der Patienten unter 6 Monaten (4). Die Entschlüsselung der Karzinogenese des Peniskarzinoms auf molekularer Ebene könnte zu effektiveren individualisierten Therapien führen. Bisherige Daten zeigen, dass der PI3K/ mTOR/ AKT Signalweg einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen darstellt (5). Die Serin / Threoninkinasen mTOR und Akt regulieren zusammen mit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und weiteren Proteinen als Signalkaskade grundlegende Funktionen einer Zelle, wie das Überleben, das Wachstum und die Proliferation (6). Inwieweit sich aus dem PI3K/ mTOR/ AKT Signalweg prognostische oder diagnostische Tumormarker für das Peniskarzinom ableiten lassen, ist noch nicht abschließend geklärt. In der vorliegenden Arbeit wird der Zusammenhang von neun verschiedenen Proteinen aus dem PI3K/ mTOR/ AKT Signalweg mit klinisch-pathologischen Parametern und Überlebensdaten korreliert und ihr Wert als Biomarker geprüft.

Peniskarzinom

Die Inzidenz des Peniskarzinoms liegt in Europa und den USA unter 1/100000 Einwohnern (7). Europaweit werden jedoch regionale Unterschiede beobachtet. Die Inzidenz beträgt in einer Untersuchung von Parkin et al. (1) in Spanien in der Region Albacete ca. 1.8/100000, auf Malta 1.6/100000 oder auch in der Schweiz in der Region Neuchâtel 1.5/100000 und liegt somit deutlich höher als vergleichsweise in Slowenien mit 0.5/100000 oder Italien in der Region Sassari mit 0.5/100000. In Entwicklungsländern tritt das Peniskarzinom dagegen etwas häufiger auf. Beispielsweise liegt die Inzidenz in Uganda bei 4/100000 Einwohnern (21). Simbabwe hat dagegen eine Inzidenz von 1.6/100000 Einwohnern. In Indien (Mumbai) liegt die Inzidenz bei 1.2/100000 Einwohnern. Im Gegensatz dazu ist die Inzidenz in der jüdischen Bevölkerung in Israel sehr niedrig bei weniger als 0.04/100000 Einwohnern. Die unterschiedlichen Inzidenzen lassen sich durch soziale, religiöse und kulturelle

Verhaltensweisen erklären (8). Als Risikofaktoren für die Entstehung eines Peniskarzinoms wurden Retention von Smegma und damit verbundene schlechte Genitalhygiene (9), chronische Balanoposthithiden und Lichen sclerosus (10), junges Alter beim ersten Geschlechtsverkehr und häufig wechselnde Geschlechtspartner (11), Nikotinabusus (12), niedriger sozial-ökonomischer Status, ein niedriger Bildungsgrad (13) und Erkrankungen oder Verletzungen im Bereich des Penis (12) identifiziert. Weiterhin gilt eine Infektion mit dem Humanen Papilloma Virus (HPV) als Risikofaktor (14, 15). Im systematischen Review von Backes et al. (7) steht bei ungefähr der Hälfte der Fälle eine Infektion mit dem HPV-Virus im Zusammenhang mit Plattenepithelkarzinomen des Penis. Am häufigsten treten die High-Risk Subtypen HPV 16 und 18 im Tumorgewebe auf (15). In der Arbeit von Maden et al. (16) stellte sich vor allem Phimose als Risikofaktor für eine spätere Erkrankung heraus. Die Zirkumzision im Neugeborenenalter zeigt in der Arbeit von Tsen et al. (17) eine signifikante Reduktion der Peniskarzinomerkrankungen. Allerdings beschreiben Christakis et al. (18), dass eine hohe Zahl von Zirkumzisionen nötig ist (n=900), um eine Erkrankung an Peniskarzinom zu verhindern. Der operative Eingriff an der Vorhaut birgt auch Risiken. In der obengenannten Studie trat bei zwei Patienten eine Komplikation nach dem Eingriff auf, während lediglich eine Erkrankung mit Peniskarzinom verhindert wurde. Sodann entsteht das Peniskarzinom häufig im Bereich der oberen Schichten des inneren Vorhautblatts, der Glans penis, oder des Sulcus coronarius. (19). Ein typischer Befund imponiert im Frühstadium mit einer Induration oder einer blumenkohlartigen Wucherung, die häufig druckempfindlich ist (20). Zu 95% entwickelt sich das Peniskarzinom aus Plattenepithel, daher weist es biologische Ähnlichkeiten mit den Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx, des äußeren weiblichen Genitals und des Anus auf (2). Histologische Subtypen des Peniskarzinoms werden hinsichtlich ihrer Entwicklung, ihres Wachstumsmusters, der klinischen Aggressivität, Assoziation mit einer HPV-Infektion und der Prognose für das Gesamtüberleben unterschieden (2, 21). In etwa 5 bis 15 % der Fälle liegen papilläre Karzinome mit guter Prognose und niedriger Metastasierungstendenz vor (2). Basaloide Karzinome treten in ca. 4 bis 10 % der Fälle auf und gehen mit einer schlechteren Prognose einher (22). Warzige Karzinome machen 7 bis 10 % der Fälle aus, metastasieren selten und haben meist eine gute Prognose. Ca. 3 bis 8 % der Fälle sind verruköse Karzinome, die mit einer guten Prognose einhergehen. Sarkomatoide Karzinome sind mit ca. 1 bis 2 % selten, haben jedoch eine sehr

schlechte Prognose und eine frühe Metastasierungsneigung (2). Weiterhin treten selten Absiedelungen von Metastasen anderer Tumorentitäten wie Urothel-, Prostata-, Adeno- und kolorektalen Karzinomen, Melanomen, Lymphomen oder mesenchymalen Tumoren am Penis auf (23). Bei Verdacht auf Peniskarzinom werden Glans, Präputium, Penisschaft und die Inguinalregion inspiziert und palpirt. Mittels Sonographie kann eine Schwellkörperinfiltration und Leistenlymphknoten untersucht werden, um Ausmaß und Infiltrationstiefe des Tumors einzuschätzen (2, 24). Zur Diagnosesicherung wird eine Gewebeprobe des verdächtigen Areals entnommen und histologisch aufgearbeitet (24). Zum Staging und zur Therapieplanung können bildgebende Verfahren, wie Magnetresonanztomographie (MRT), Computertomographie (CT) und Positronenemissionstomographie (PET) herangezogen werden (25). Ab Stadium pT1G2 wird ein invasives Staging (inguinale Lymphadenektomie oder Sentinel-Biopsie) durchgeführt (26). Nach Diagnosestellung erfolgt die Feststellung der anatomischen Ausbreitung mittels der aktuellen TNM-Klassifikation nach UICC 2020 (27, 28). Die TNM Klassifikation ist in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1 TNM Klassifikation nach UICC (26, 28)

Klinische Beurteilung	
T - Primärtumor	
TX	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
Ta	nichtinvasives lokalisiertes Karzinom
T1	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe <u>Glans</u> : Tumor infiltriert Lamina propria; <u>Vorhaut</u> : infiltriert Dermis, Lamina propria oder Dartos'sche Faszie; <u>Schaft</u> : Tumor infiltriert Bindegewebe zwischen Epidermis und Corpora unabhängig der Lokalisation; <u>Alle</u> : Lokalisation mit/ohne lymphvaskuläre oder perineurale Infiltration und/oder schlecht differenziert/undifferenziert
T1a	subepitheliales Bindegewebe infiltriert, ohne lymphvaskuläre oder perineurale Infiltration, nicht schlecht differenziert/undifferenziert/sarkomatoid
T1b	subepitheliales Bindegewebe infiltriert, mit lymphvaskulärer Infiltration und/oder perineuraler Invasion oder schlecht differenziert/undifferenziert/sarkomatoid
T2	Tumor infiltriert Corpus spongiosum (entweder Glans oder ventraler Schaft) mit/ohne Invasion der Urethra
T3	Tumor infiltriert Corpus cavernosum mit/ohne Urethra
T4	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen

N - Regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	keine palpablen oder sichtbar vergrößerten Lymphknoten
N1	ein palpabler mobiler einseitiger Leistenlymphknoten
N2	multiple oder beidseitige palpable mobile inguinale Lymphknoten
N3	fixierte inguinale Lymphknotenpakete oder uni- oder bilaterale pelvine Lymphadenopathie
M - Fernmetastasen	
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
Pathologische (histologische) Beurteilung	
(Die Einteilung pT entspricht der Einteilung nach klinischen Aspekten, der Lymphknotenstatus wird anhand einer Biopsie oder eines chirurgischen Resektats beurteilt).	
pT – Primärtumor	
pTX	Primärtumor nicht beurteilbar
pT0	Kein Anhalt für Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ
pTa	nichtinvasives lokalisiertes Karzinom
pT1a	subepitheliales Bindegewebe infiltriert, ohne lymphovaskuläre oder perineurale Infiltration, nicht schlecht differenziert/undifferenziert/sarkomatoid
pT1b	subepitheliales Bindegewebe infiltriert, mit lymphovaskulärer Infiltration und/oder perineuraler Invasion oder schlecht differenziert/undifferenziert/sarkomatoid
pT2	Tumor infiltriert Corpus spongiosum (entweder Glans oder ventraler Schaft) mit/ohne Invasion der Urethra
pT3	Tumor infiltriert Corpus cavernosum mit/ohne Urethra
pT4	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen
pN - Lymphknoten	
pNX	Keine Beurteilung der Regionale Lymphknoten möglich
pN0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastase/Metastasen in einem oder zwei Leistenlymphknoten
pN2	Metastasen in mehr als zwei unilateralen inguinalen oder bilateralen Leistenlymphknoten
pN3	Metastase/Metastasen in Beckenlymphknoten uni- oder bilateral, oder extranodale Ausbreitung regionärer Lymphknoten
pM - Fernmetastasen	
pMX	Fernmetastasen nicht beurteilbar
pM0	keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen
G – Grading (histopathologischer Differenzierungsgrad)	
GX	Differenzierungsgrad nicht beurteilbar
G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3 - G4	schlecht bis undifferenziert

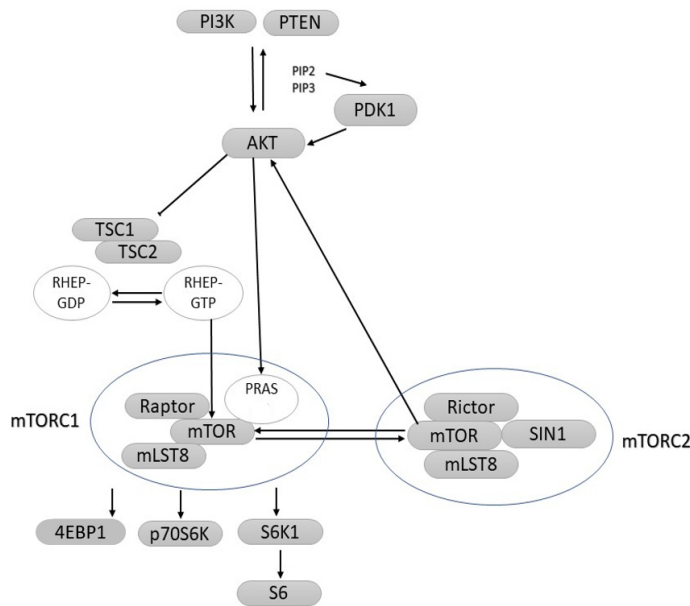
Die Infiltrationstiefe des Tumors hat bedeutenden Einfluss auf die lymphogene Metastasierung. Im oberflächlichen pTa Stadium werden in regionären Lymphknoten in weniger als 10% der Fälle Metastasen beobachtet. Bei invasiven pT1-Tumoren treten bei ca. 60% der Fälle, bei pT2-Tumoren bei mehr als 75% aller Fälle Lymphknotenmetastasen auf. (29). Neuere Erkenntnisse legen nahe, dass auch Differenzierungsgrad und vaskuläre Invasion, prognostische Marker für das Auftreten von inguinalen Metastasen sind (30). Tastbare Lymphadenopathie oder ein positiver Lymphknotenbefund in der Bildgebung stehen mit einer schlechten Prognose für das Gesamtüberleben im Zusammenhang (30). Patienten werden zur Einschätzung der Prognose, Auftreten von Rezidiven und Metastasen von der European Association of Urology (EAU) je nach T-Stadium und Grading des Primärtumors in Niedrig -, Intermediär- und Hoch-Risikogruppen eingeteilt (Low-, Intermediate-, High-Risk) (30, 31). Zur Niedrig-Risikogruppe zählen die Tumorstadien pTis-, pTa, pT1G1, zur Intermediär-Risikogruppe pT1G2 und zur Hoch-Risikogruppe pT2 oder G3. In der Hoch-Risikogruppe besteht ein hohes Risiko für lymphovaskuläre Ausdehnung und regionale Lymphknotenmetastasierung des Tumors (28). Insgesamt wird bei der Therapie der Primärtumor, unter bestmöglicher Organerhaltung, vollständig entfernt. Gute Funktionalität und ein angemessenes kosmetisches Ergebnis sollen angestrebt werden (26). Nicht invasive Tumoren können topisch mit Imiquimod oder Fluorouracil oder mittels Lasertherapie zum Beispiel Nd:YAG Laser (Neodym:Yttrium-Aluminium-Granat-Laser), CO₂ Laser (Kohlenstoffdioxid) oder durch Exzision des betroffenen Areals behandelt werden (2, 32). Dabei sollen Patienten langfristig angebunden und überwacht werden (33). Bei invasiven Tumoren wird, bei Befall des Präputiums, eine totale Zirkumzision durchgeführt. Läsionen an der Glans penis werden mittels Keilexzision entfernt (34). Im Stadium pT2 erfolgt eine Penistellresektion oder Glansektomie. Optional besteht die Möglichkeit einer Bestrahlung. Ab Stadium pT3 wird eine totale Penektomie mit ausreichendem Sicherheitsabstand zum Tumorrand empfohlen. Die Harnröhre wird nach perineal ausgeleitet (Boutonniere). Im Stadium pT4 kann die totale Penektomie und Anlage einer Boutonniere durch adjuvante und neoadjuvante Chemotherapie und Strahlentherapie ergänzt werden (2, 20).

mTOR Signalweg

Die Proteine mTOR, PI3K und Akt sind Regelenzyme, die ubiquitär in der Zelle vorkommen und durch Signalkaskaden grundlegende Funktionen einer Zelle, wie

Überleben, Wachstum und Proliferation steuern (6, 35). Über den mTOR Signalweg passt die Zelle den Energiestoffwechsel, die Proteinsynthese, die Lipogenese und die Organisation des Zytoskeletts an intra- und extrazelluläre Einflüsse an (6, 36). mTOR bildet dabei zwei Protein-Komplexe, die sich in ihrer Funktion unterscheiden: mTOR Komplex1 (mTORC1) und mTOR Komplex2 (mTORC2) (6). Die Aktivität dieser Komplexe wird durch das Zusammenspiel weiterer Proteine gesteuert. Der mTORC1-Komplex setzt sich aus den Proteinen mTOR, Raptor, mLST8 (gleichnamig GβL) und PRAS40 zusammen. Der mTORC2-Komplex besteht aus mTOR, mSin1, mLST8 und Rictor. Wachstumsfaktoren wie IGF-1, HER, VEGFR im Zusammenspiel mit dem PI3K/ Akt Signalweg, wirken aktivierend auf mTOR (37). Hemmende Einflüsse wirken auf mTOR und Akt über TSC1, und TSC2 und PTEN (35). Das Enzym FKBP38 wirkt inaktivierend auf den mTORC1Komplex (37). TSC2 und PRAS sind Substrate der Akt Kinase. Sie werden durch Phosphorylierung von Akt inaktiviert. Eine Inaktivierung von PRAS und TSC2 führt letztendlich zu einer Aktivierung von mTORC1. Die Aktivierung hat einen fördernden Effekt auf die nachgeschalteten Effektoren 4EBP1 und p70S6K. Die beiden Enzyme steuern die ribosomale Translation von mRNA Proteinen. 4EBP1 treibt durch Dissoziation von eIF4E den Zellzyklus, die Neoangiogenese, Proliferation und Hemmung der Apoptose an (38). Diese anabolischen Stoffwechselfunktionen folgen aus der vermehrten Translation von Cyclin D1, Hypoxia-inducible-Factor und C-myc. P70SK6 initiiert eine vermehrte Synthese von ribosomalen Proteinen und Elongationsfaktoren (39). Der mTORC2 Komplex wirkt regulierend auf die Akt Kinase. Extrazelluläre Einflüsse bewirken über die Bindung an Rezeptoren der Zelloberfläche eine Phosphorylierung von PI3K (40). Dies aktiviert durch Phosphorylierung die Akt Kinase, welche mTOR stimuliert (39). Die intrazellulären Verknüpfungen sind schematisch in der Abbildung (Abb.) 1 dargestellt. Erwähnenswert ist, dass maligne urogenitale Tumoren, beispielsweise Prostata-, Blasen- und Nierenzellkarzinom eine Veränderung der mTOR Signalkaskade durch Fehlregulationen bei Onkogenen sowie Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen zeigen (41). Beim Prostatakarzinom wurde zum Beispiel der Verlust von PTEN und eine Aktivierung der Akt-Kinase durch Mutation von PI3K nachgewiesen (38, 41).

Abb. 1 PI3K/ mTOR/ AKT Signalweg In Anlehnung an Memmott et al. (37)



Beim Peniskarzinom stehen die intrazellulären Signalwege und ihre Veränderungen bei maligner Entartung im Fokus der aktuellen translationalen Forschung. So untersuchten Chaux et al. (42) bei 112 Patienten mit invasivem Plattenepithelkarzinom des Penis anhand von TMA's die immunhistochemische Expression der Biomarker mTOR, PTEN, pAkt, pmTOR und pS6. Dabei suchten die Autoren nach Zusammenhängen zwischen dem histologischen Typ, dem histologischen Grad, dem Vorliegen einer Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV) und der Expression der Biomarker. Hierbei bestand keine signifikante Korrelation von PTEN und pAkt mit dem histologischen Grading. Sie fanden lediglich einen Trend, dass sich pAkt bei höheren G-Stadien erhöht zeigte. Dagegen hing eine niedrige Expression von pS6 signifikant mit niedrigen T-Stadien zusammen. pAkt und pmTOR zeigten eine Tendenz bei höheren T-Stadien erhöht zu sein. Die Ergebnisse von Chaux et al. (42) deuten zudem auf eine Aktivierung des mTOR-Signalwegs bei Peniskarzinom hin, meist durch den Verlust, beziehungsweise einer Abnahme der Expression von PTEN und verbunden mit einer Aktivierung von pS6. Stankiewicz et al. (43) untersuchten in einer Kohorte von 148 Patienten mit einem Peniskarzinom den Zusammenhang zwischen dem intrazellulären Protein PTEN und membranständigen Rezeptoren der HER-Familie mit der Aktivierung des Enzyms Akt in HPV positiven und negativen Fällen mittels Immunhistochemie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. HER3 galt hierbei als starker Aktivator des PI3K / Akt-Signalwegs. Stankiewicz et al. zeigten, dass die HER3 Expression stark positiv mit der zytoplasmatischen Akt1-Expression korrelierte.

Die Proteine HER3, HER4 und Akt1 korrelierten positiv mit dem Tumorgrading. In dieser Arbeit stand der Verlust von PTEN nicht im Zusammenhang mit der Expression von pAkt. Die pEGFR-Expression korrelierte weiterhin mit der Expression von pAkt, jedoch nicht mit dem Tumorgrad oder -stadium. Azizi et al. (44) analysierten in ihrer Arbeit anhand von TMAs die prognostische Wertigkeit des PI3K-Akt-mTOR-Signalweg bei 57 Patienten mit einem Peniskarzinom. Weiterhin untersuchten sie den HPV Status der Gewebeproben mittels In-situ-Hybridisierung. Hierbei zeigte sich die Tendenz, dass eine niedrige PTEN Expression mit einer geringen lymphovaskulären Ausdehnung im Zusammenhang stand. Ferner wurde für pAkt ein signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhter Expression und niedrigem Grading des Primärtumors demonstriert. Es zeigte sich ein Trend, dass eine erhöhte pAkt Expression mit niedrigem N-Status, lokaler Ausdehnung, und lymphovaskulärer Invasion assoziiert war. Bei der Korrelation der Expression von pS6 mit den klinischen Parametern wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Ferner zeigte sich die Tendenz, dass eine erhöhte pS6 Expression mit einem niedrigen T-Stadium, einherging. Es bestand weiterhin ein tendenzieller Zusammenhang einer hohen pS6 Expression mit einer geringeren lymphovaskulären Ausdehnung und geringem N-Stadium. Generell sahen die Autoren eine Aktivierung des PI3K-Akt-mTOR-Signalwegs und die Infektion mit HPV begünstigend für die Entstehung eines Peniskarzinoms an. Ferrandiz-Pulido et al. (45) untersuchten zelluläre Proteine des mTOR Signalweges in Geweben von 67 Patienten mit invasivem Peniskarzinom. Dabei verglichen sie die Expression von p53, pmTOR, pERK, p4EBP1, eIF4E und pEIF4E in Tumorzellen mit der in Normalgewebe. Sie zeigten, dass pmTOR, p4EBP1, pIF4E und pEIF4E im Vergleich zu Normalgewebeproben in den Tumorzellen erhöht vorlagen. Dies legte für die Autoren einen Zusammenhang nahe, dass beim Peniskarzinom die Aktivierung des mTOR-Signalweges eine grundlegende Rolle spielte. Weiterhin stand eine erhöhte Expression von pmTOR, pEIF4E und p53 in Korrelation mit dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen. Bei erhöhter Expression von pEIF4E und p53 kam es häufiger zu Rezidiven, Metastasierung und tumorspezifischem Versterben. Die Proteine pERK und p3EBP1 waren mit niedrigem T-Stadium assoziiert. HPV negative Tumoren zeigten eine erhöhte pmTOR und p53 Expression. Die Forschungsgruppe schlussfolgerte, dass die Aktivierung des mTOR - Signalweges zur Entstehung und Progression des aggressiven Peniskarzinoms beitragen könnte. Neben Veränderungen in intrazellulären Signalwegen kann auch

eine Infektion mit dem Humanen Papillomavirus zur Karzinogenese verschiedener Tumorarten beitragen. Chaux et al. (42) untersuchten an TMAs von Peniskarzinomen den Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer HPV-Infektion und der Expression von mTOR, PTEN, pAkt, pmTOR und pS6. In dieser Analyse waren die analysierten Biomarker nicht signifikant mit dem HPV-Status assoziiert. In der bereits erwähnten Arbeit von Stankiewicz et al. (43) wurde der Zusammenhang von Rezeptoren der HER Familie und PTEN mit dem HPV-Status bei Peniskarzinom untersucht. Die Infektion mit HPV wurde durch PCR bestimmt. Hierbei war die Expression von pEGFR bei HPV-positiven Tumoren signifikant seltener als bei HPV-negativen Tumoren. Weiterhin standen HER4-, pAkt, Akt und PTEN Expression nicht mit HPV im Zusammenhang. Die HER3-Expression in HPV-positiven Fällen war signifikant häufiger und korrelierte positiv mit der zytoplasmatischen Akt1-Expression. HER4- und PTEN-Proteinexpression standen in keinem Zusammenhang mit einer HPV-Infektion.

Methoden

Klinische Daten

Die Genehmigung der Ethik-Kommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz (Nummer 2018-13156) lag zu Beginn der Studie vor. Für 124 Patienten mit Peniskarzinom existierten Daten für den Zeitraum 1980 bis 2018. Alle Patienten wurden in der urologischen Abteilung der Universitätsmedizin Mainz betreut und behandelt. Vereinzelt Patienten wurden in auswärtigen Kliniken voroperiert und an der Universitätsmedizin Mainz nachbetreut. Die klinischen Daten der Patienten wurden aus Behandlungsberichten der medizinischen Fachabteilungen, Pathologieberichten, Arztbriefen und Operationsberichten systematisiert. Weiterhin wurde Kontakt mit den behandelnden niedergelassenen Urologinnen/Urologen und Hausärztinnen/Hausärzten aufgenommen, um Informationen über das Follow-Up der Patienten zu erhalten. Die Aufstellung der Daten erfolgte in Microsoft® Excel® (Microsoft 365 MSO Version 2110 Build 16.0.14527.20234, Dublin, Irland) in tabellarischer Form. Von den Patienten wurden Name, Geburtsdatum, Adresse, niedergelassene Urologin/Urologe, Hausärztin/Hausarzt. Weiterhin wurden die klinischen Daten Aufnahmezeitpunkt in der Klinik, Nebendiagnosen (dichotomisiert vorhanden oder nicht vorhanden): Koronare Herzkrankheit, Diabetes mellitus, Adipositas, Balanoposthitis, Nikotinabusus, COPD, Alkoholabusus, Phimose, Kondylome, Lichen sclerosus, Leukoplakie, Morbus Bowen), Symptome

(Beschreibung und Zeitraum) und Alter bei Erstdiagnose erfasst. Weiterhin wurde der pTNM Status nach UICC-Klassifikation (jeweils pT-Status (pT1a und pT1b soweit ermittelbar), pM-Status, pN-Status und Grading erfasst, wobei bei Angabe des Gratings in Zwischenstadien das höhere Grading gewählt wurde. Daneben wurden erfasst: Vorliegen einer HPV Infektion (vorhanden oder nicht vorhanden), Bildgebung der Leiste (nicht durchgeführt, unauffällig, unspezifisch vergrößert, suspekt auf Metastasen), Bildgebung des Thorax (nicht durchgeführt, unauffällig, suspekt auf Metastasen), Zeitraum von Erstdiagnose bis Operation in Tagen, Therapie (Art der Operation: partielle Penektomie, totale Penektomie, Zirkumzision, Tumorexzision) und Eingriffsdatum der inguinalen oder pelvinen Lymphadenektomie. Weiterhin wurden erfasst: Lymphadenektomie inguinal oder pelvin (nicht durchgeführt, nur links durchgeführt, nur rechts durchgeführt, beidseits durchgeführt), Anzahl entfernter Lymphknoten, Anzahl positiver Lymphknoten, Lymphknotenmetastasen (vorhanden oder nicht vorhanden), Zeitraum Erstdiagnose bis Lymphadenektomie inguinal oder pelvin in Tagen, weitere Therapie (keine, Chemotherapie, Radiatio, Chemotherapie und Radiatio), Chemotherapeutischer Ansatz (Cisplatin, 5-FU; Cisplatin, 5-FU, Paclitaxel; Carboplatin, 5-FU, Folinat; Cisplatin, Methotrexat; Bleomycin, Vinblastin, Doxorubicin, Dacarbacin; Bleomycin; lokale Chemo Cisplatin, Novemtron), Anzahl der Zyklen Chemotherapie und Zeitraum der Chemotherapiedurchführung in Monaten. Dazu wurden aufgeführt: Überleben (lebt aktuell noch; verstorben), Sterbedatum, Todesursache (tumorspezifisch, nicht tumorspezifisch, unbekannt), Lymphknotenmetastasen (vorhanden oder nicht vorhanden), Zeitraum von Erstdiagnose - Last Follow Up (letzter Kontakt oder Tod) in Tagen, Datum letztes Follow Up, Rezidivzeitpunkt, Zeitraum Erstdiagnose bis Rezidiv in Tagen, Rezidiv Staging (nach UICC-Klassifikation pT-Status (unterklassifiziert in pT1a und pT1b), pM-Status, pN-Status, Grading, Zeitraum von Erstoperation bis Rezidiv in Tagen, Therapie des Rezidivs (totale Penektomie, lokale Exzision, Zirkumzision, Penisteilamputation), Lymphadenektomie bei Rezidiv (ja oder nein), Datum Lymphadenektomie bei Rezidiv, Rezidivlokalisierung (keine, Lokalrezidiv, Regionalrezidiv, Fernrezidiv, unbekannt). Von den $n_{\text{Gesamt}} = 124$ Patienten, konnten $n_{\text{ohne_Probe}} = 48$ Patienten, für die keine Gewebeproben vorlagen, in der Auswertung in Bezug auf die Biomarkerexpression nicht berücksichtigt werden. Bei $n_{\text{Probe}} = 76$ Patienten, mit vorliegender Gewebeprobe wurden, sämtliche klinische Variablen mit der Antikörperexpression von p4EBP1, pp70S6K, pS6, pPRAS, pmTOR, S6K1, pAkt, Akt und mTOR, sowie HPV Infektion

korreliert. In der Auswertung wurde das Grading gruppiert, indem G1 und G2 zusammen gegen G3 und G4 verglichen wurden. Ein Stadium pT4 war in diesem Patientenkollektiv nicht vertreten.

Tissue Microarray (TMA) und immunhistochemische Färbung

In dieser Studie wurden die Antikörper p4EBP1 (T37/46) (Cell Signaling Technology, Danvers, USA, #2855), pp70S6K (T389) (Cell Signaling Technology, #9206), pS6 (S235/236) (Cell Signaling Technology, #4858), pPRAS (T246) (Cell Signaling Technology, #2997), pmTOR (Cell Signaling Technology, #2976), panAkt (Cell Signaling Technology, #4691), S6K1 (Abcam, Cambridge, UK, # ab32359); mTOR (Cell Signaling Technology, #2983), and pAkt (S473) (Dako Agilent Technologies, Santa Clara, USA, #S473) verwendet. Tabelle 2 listet die Antikörper auf. Zunächst wurden die verwendeten Antikörper in Zellkulturexperimenten mittels Positiv- oder Negativkontrollen durch immunhistochemische Färbungen auf Spezifität getestet. Zur Überprüfung der Positiv- und Negativkontrollen wurden zusätzlich Immunoblots (Western Blots) durchgeführt. Alle Antikörper konnten validiert werden.

Die in Formalin fixierten Gewebeproben wurden in einem Gewebeerwässerungsautomaten Sakura Tissue – Tek VIP 5 (Sakura Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, Niederlande) entwässert. Anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe der Ausgießstation Paraffineinbettssystem TES 99 (MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland) in einen Paraffinblock (Klinika Medical GmbH, Usingen, Deutschland) gegeben. Danach wurde ein 2 µm dicker Schnitt hergestellt und auf einen Objektträger gezogen. Auf diesem Schnitt wurde das Tumoreal unter dem Mikroskop markiert. Mit dem TMArrayer (Pathology Devices, San Diego, USA) wurden Doubletten von 1 mm Durchmesser aus dem Tumoreal der Proben im Paraffinblock gestanzt. Diese wurden systematisch in einen Paraffinblock übertragen. Anschließend wurden 3 µm dicke Schnitte angefertigt, die auf einen beschichteten Objektträger gezogen wurden. Die Schnitte wurden anhand des Standard Färbeprotokolls von 02/2011 Dako Cytomation / Autostainer plus /Envision Flex Kit (Dako EnVision TM FLEX HRP/Dab; K 8010) vorbereitet und mit dem Dako Cytomation, DAKO Autostainer^{plus} (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) gefärbt. Die Objektträger wurden zunächst entparaffiniert, indem sie für 15 Minuten bei 60 °C in den Brutschrank gestellt werden und danach 3 x 5 Minuten in Xylol (SAV Liquid

Production GmbH, Flintsbach a. Inn, Deutschland) gelegt wurden. Daraufhin wurde der Objektträger mit destilliertem Wasser (Delta) abgewaschen.

Für das anschließende Antigen-Retrieval wurde ein Citrat Puffer pH 6 (Dako EnVision Flex Target Retrieval Solution low pH; DM829; Lot 20048823) für 20 Minuten erhitzt und die Objektträger anschließend 35 min im Puffer gekocht. Als Ausnahme wurde Akt-pS473 bei pH 9 mit EDTA Puffer (Dako EnVision Flex Target Retrieval Solution high pH; Lot 20048823) für 20 Minuten vorbehandelt. Der Objektträger wurde unter fließendem Wasser abgekühlt und 1mal für 5 Minuten mit einem Waschpuffer (Dako EnVision TM FLEX (20x) Wash Buffer; DM831; Lot 20051557) gewaschen. Die weitere Prozessierung der Objektträger erfolgte in dem Autostainer (Dako), hierzu wurden die primären Antikörper jeweilig verdünnt (Dako EnVision TM FLEX / Antibody Diluent; DM830; Lot 20048476).

Nach der Beendigung der Färbung im Autostainer, wurden die Objektträger in Leitungswasser gebläut und für fünf Minuten in destilliertem Wasser (Delta) gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je zwei Minuten dehydriert und zwei Mal für je fünf Minuten mit Xylol behandelt. Danach wurden die Proben mit Entellan (VWR (Merck) International GmbH, Darmstadt, Deutschland) eingedeckelt. Die fertigen Objektträger wurden mit dem Nano Zoomer 2.0HT (Hamamatsu Photonics K. K. Hamamatsu City, Japan) eingescannt und ausgewertet.

Die Expression der Biomarker wurde in Qualität und Quantität angegeben. Qualität beschreibt die Intensität der Färbung: Die Abbildung 2 zeigt die Intensität: 0 (negativ), Abbildung 3: 1 (schwach), Abbildung 4: 2 (mittel), und Abbildung 5: 3 (stark). Die Quantität beschreibt den prozentualen Anteil der positiven Zellen. Bei der Quantität entsprachen 0 und 1 weniger als 25%, 2 weniger als 50% und 3 mehr als 50 %.

Tabelle 2 Antikörper

Name (ggf. Phosphorylierungsstelle)	Hersteller	Art. Nr.	Lot	Herkunft	Klon	pH-Wert Antigen-Demaskierung	Verdünnung	Inkubationszeit
p4EBP1 (T37/46)	Cell Signaling	2855	23	Kaninchen	236B4	pH 6 - Citrat	1:100	30 min
pp70S6K (T389)	Cell Signaling	2906	22	Maus	1A5	pH 6 - Citrat	1:800	30 min
pS6 (S235/236)	Cell Signaling	4858	11	Kaninchen	D57.2.2 E	pH 6 - Citrat	1:400	30 min
pPRAS (T246)	Cell Signaling	2997	12	Kaninchen	C77D7	pH 6 - Citrat	1:50	30 min
mTOR	Cell Signaling	2983	4	Kaninchen	7C10	pH 6 - Citrat	1:50	60 min
pmTOR	Cell Signaling	2976	8	Kaninchen	49F9	pH 6 - Citrat	1:100	30 min
pAkt1 (S473)	Dako	M3628	10126 821	Kaninchen	14-5	pH 9 - EDTA	1:10	60 min
panAkt	Cell Signaling	4691	20	Kaninchen	C67E7	pH 6 - Citrat	1:200	30 min
S6K1	Abcam	ab32359	GRI49 234-1	Kaninchen	E175	pH6 - Citrat	1:30	30 min

Abb. 2 Beispiel Intensität panAkt: Intensität 0

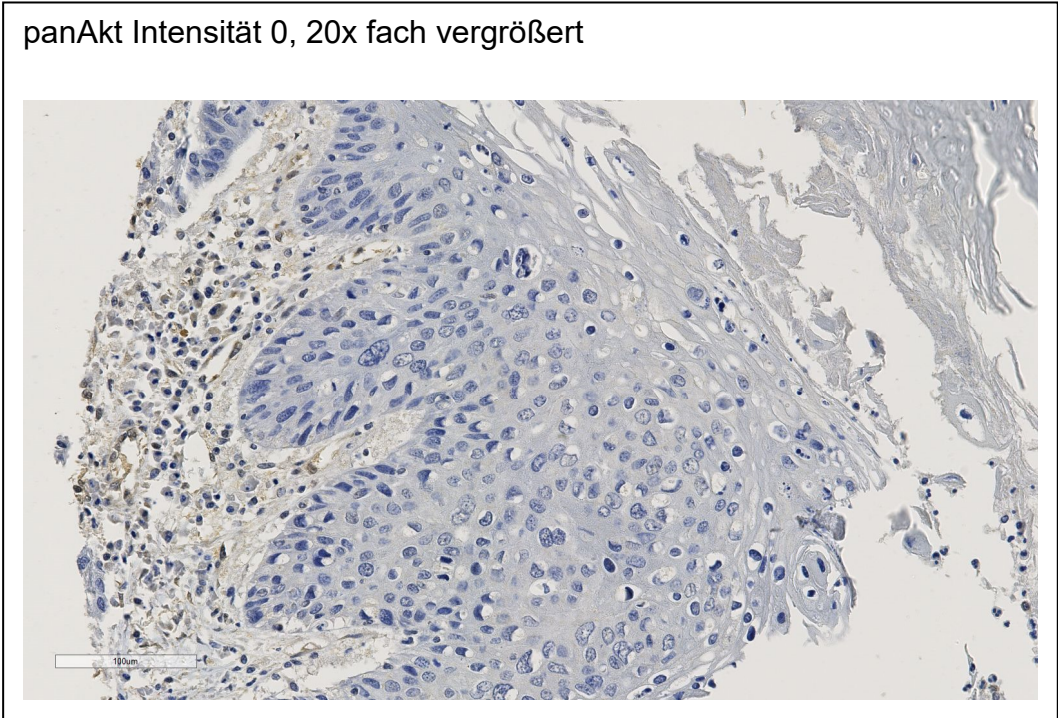
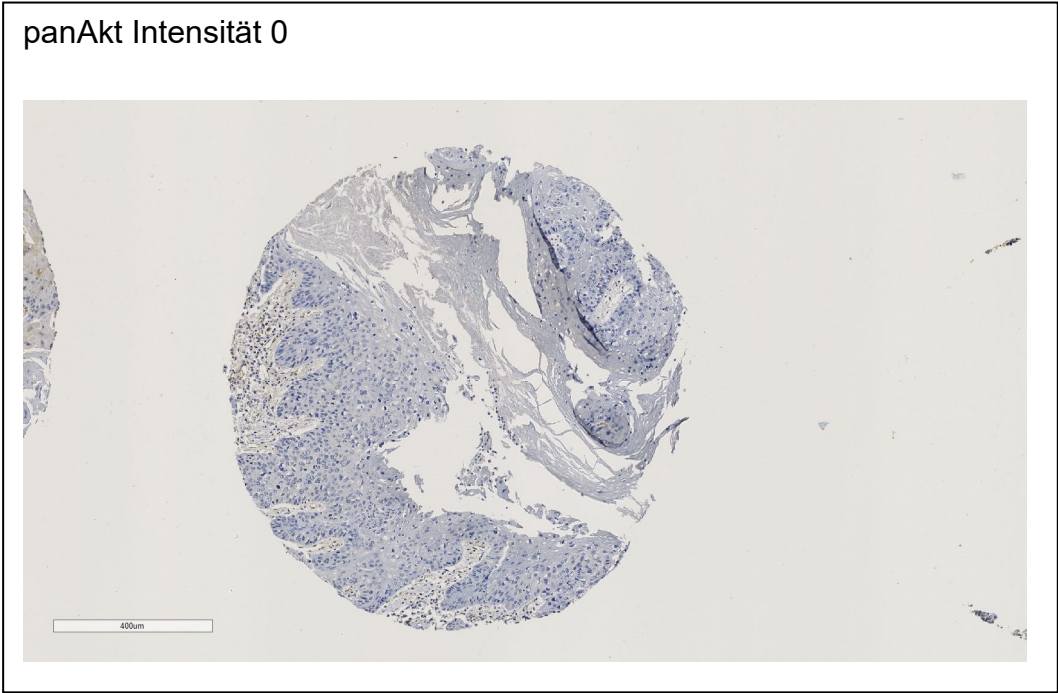


Abbildung 3 Beispiel Intensität panAkt: Intensität 1

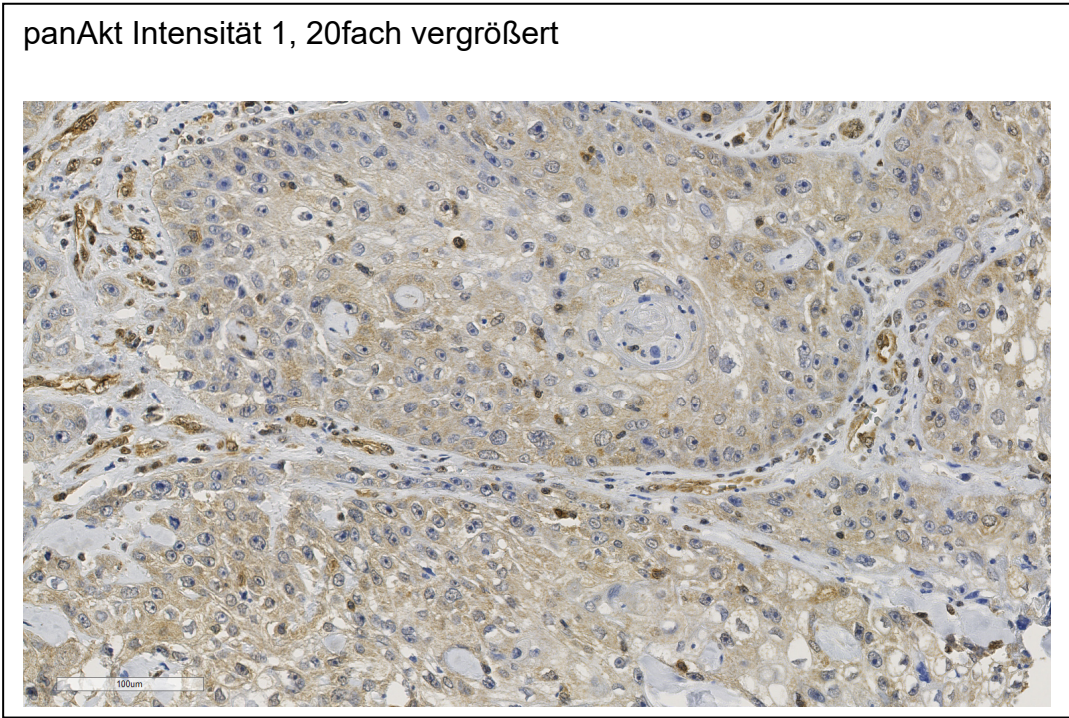
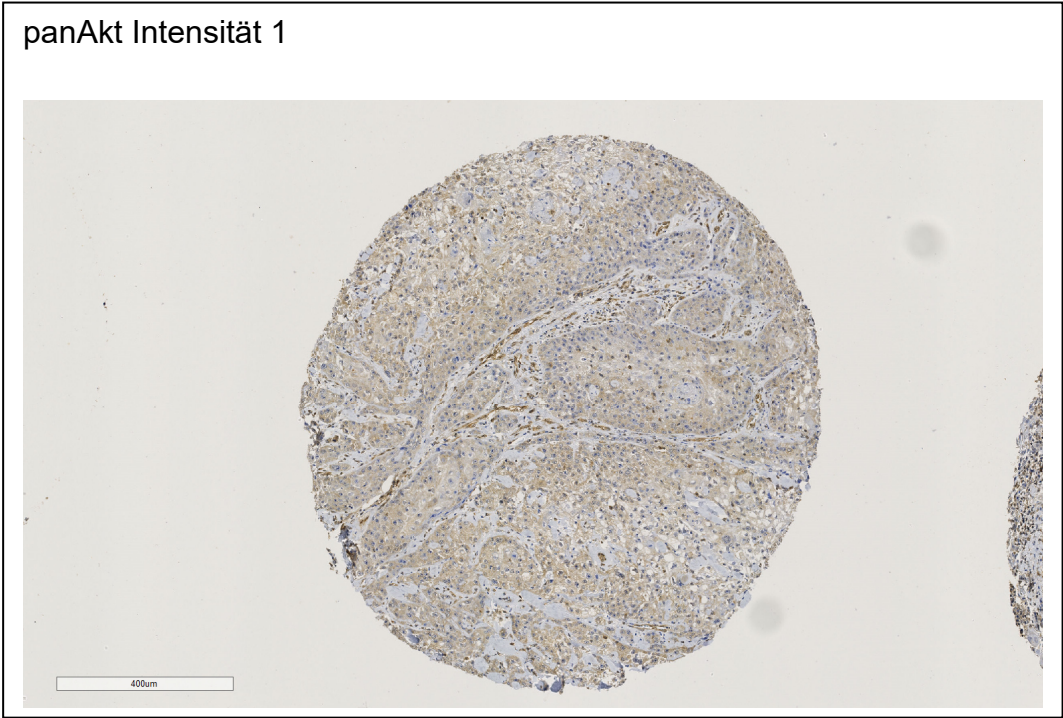
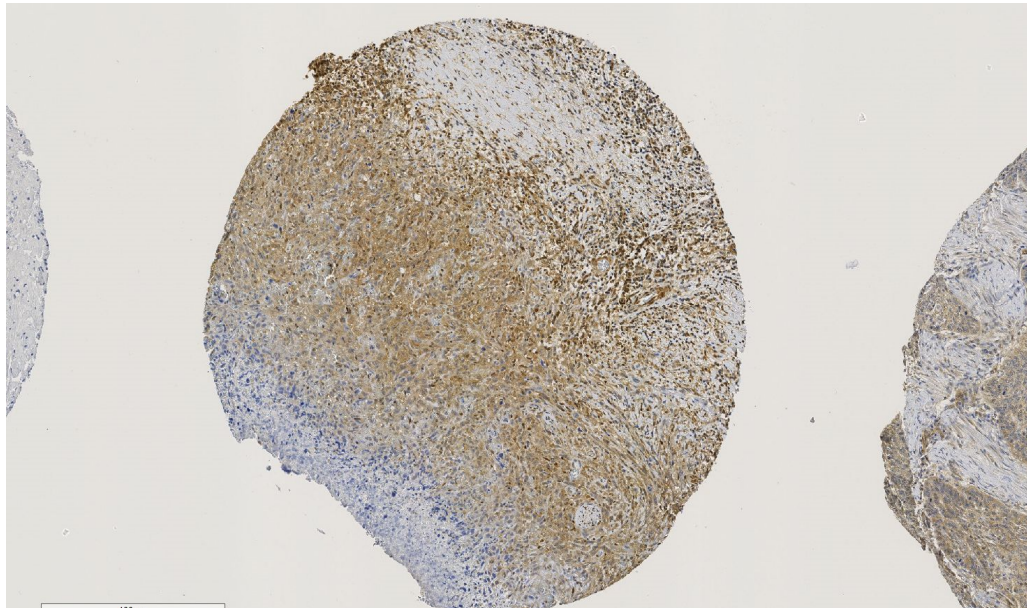


Abb. 4 Beispiel Intensität panAkt: Intensität 2

panAkt Intensität 2



panAkt Intensität 2, 20fach vergrößert

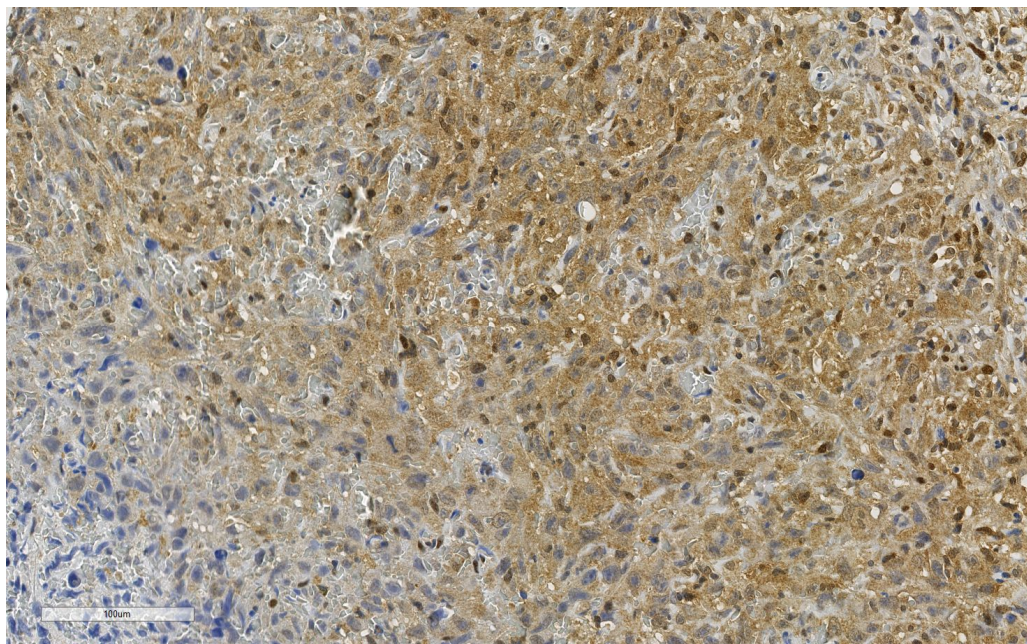
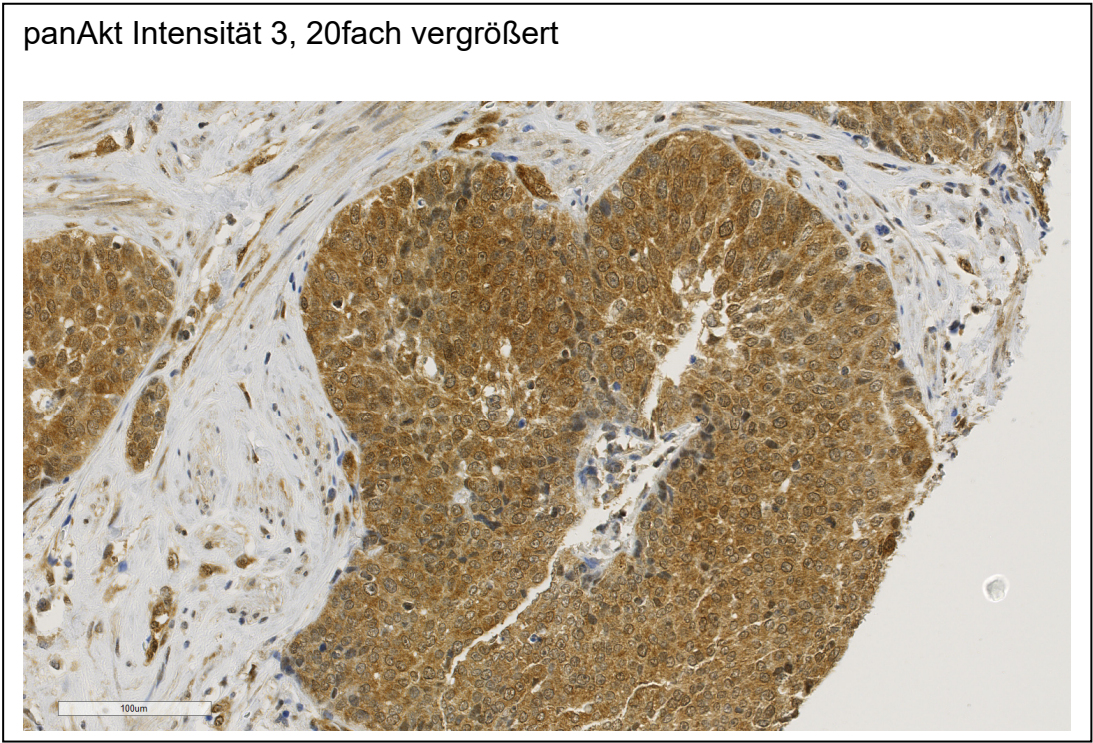
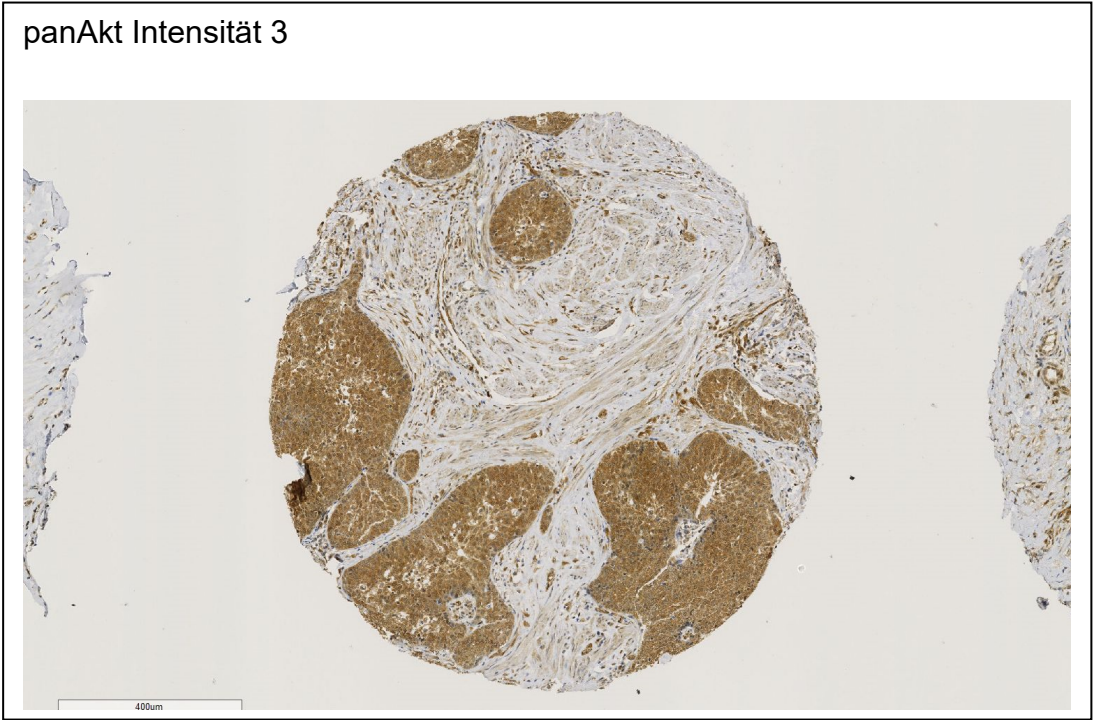


Abb. 5 Beispiel Intensität panAkt: Intensität 3



IRS – Score

Für die Auswertung der Biomarkerexpression wurde der Immunoreactive Score (IRS) verwendet. Für den IRS wurden Qualität (Intensität der Färbung) und Quantität (prozentualer Anteil der positiven Zellen) multipliziert (46). Die Intensität der Färbung wurde zwischen 0 und 3 und der prozentuale Anteil der positiven Zellen zwischen 0 und 3 angegeben. Demnach konnte der IRS zwischen 0 und 9 liegen.

HPV Analyse

Aus den jeweiligen Gewebeproben wurde ein passender Paraffinblock ausgewählt und hiervon bis zu zehn 5 µm dicke Schnitte auf Objektträger gezogen. Im Anschluss wurden diese Schnitte abgekratzt, um Tumorzellen anzureichern. Die DNA wurde dann mit dem Standard-kit RSC DNA FFPE PLUS Custom Kit AX 4920 (Promega, Madison, USA) isoliert. Der Genotyp der HPV Subtypen wurde mittels PCR basierter Sanger-Sequenzierung analysiert, (CEQ 8000 Beckman Coulter, Brea, USA). Dafür wurden folgende Primer verwendet: Human Papilloma Virus E2 Gen: Primer 4XF, Sequenz 5'-GTAACACTACGCCTATAATACA-3', Primer 184559R, Sequenz 5'-CCTGTCCAATGCCAGGT-3', Human Papilloma Virus E1 Gen: Primer 311635F, Sequenz 5'-ATAGSYATGTTAGATGATGCTACA-3', Primer 6Pack-R, Sequenz 5'-CACGTCCTTGAGAAAAGGAT-3', Major Capsid Protein L1-Region: Primer MY11 Sequenz 5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3', 5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3', Primer MY09 Sequenz 5'-GATCAGTWTCCYYTKGGACG-3'.

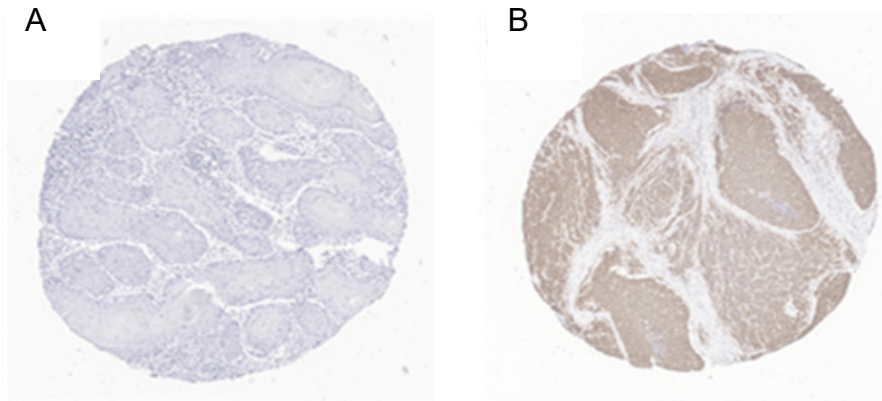
Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit dem Genome Lab GeXP Genetic Analysis System (Beckman Coulter) interpretiert. Es wurden die Subtypen HPV16 und HPV59 nachgewiesen. Bei einigen Präparaten konnte keine eindeutige Aussage über das Vorliegen einer HPV Infektion getroffen werden.

p16^{INK4a} Färbung

Die Färbung erfolgte zur Beurteilung der HPV-induzierten Tumoren. Für die immunhistochemische Färbung wurde P16-EDTA-Puffer verwendet. Mit pH 9 (Dako EnVi-sion Flex Target Retrieval Solution; K 8004; Charge 20062462 wurde zuvor die Gewinnung von hitzeinduzierten Epitopen durchgeführt. Mittels des automatisierten Färbesystems DAKO Autostainer^{plus} (Agilent Technologies) und eines Envision Flex Kits (Dako EnVision TM FLEX HRP / Dab; K 8010) erfolgte die Färbung. Es wurden p16 CINtec Histology Kit (Roche, Basel, Schweiz # E6H4) für 30 Minuten und die Avidin-Biotin-Komplex-Peroxidase-Technik verwendet. Ami-Noethylcarbazol

wurde zur Visualisierung und Hämatoxylin zur Gegenfärbung eingesetzt. Die Abbildung 8 zeigt die p16INK4a Färbung für eine negative (A) und positive (B) Probe.

Abb. 6 Beispiel immunhistochemische Färbung p16INK4a



p16INK4a-Färbung: A: negativ B: positiv

Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung wurde die Software R (www.rproject.org; Version3.6.0) und R Studio (Version1.2.1335; www.rstudio.com) verwendet. Die graphische Darstellung erfolgte mit den Programmibliotheken: ggplot2 (Version3.1.1), survminer (Version 0.4.4), ggpubr (Version0.2). Die Überlebensanalyse wurde mit den Funktionen coxph und survfit aus der Programmbibliothek survival (Version2.44.1.1) durchgeführt. Die Biomarkerexpression wurde in „hohe Expression“ und „niedrige Expression“ unterschieden. Der Schwellenwert für die Einteilung in die jeweilige Kategorie „Hohe Expression“ und „Niedrige Expression“ wurde mit Hilfe der ROC-Kurve dargestellt. Die ROC-Kurve ist eine Analysestrategie. Mittels der ROC – Kurve wird der optimale Schwellenwert eines Parameters bei semi-quantitativen Merkmalen ermittelt. In die Berechnung fließt der höchste Youden-Index ein (47, 48).

Die Zähldaten wurden mittels des exakten Fisher-Test ausgewertet. Für die Berechnung der Überlebensraten wurde die Kaplan-Meier-Methode verwendet. Die Univariate Analyse wurde mit dem Mantel-Haenszel Test durchgeführt. Bei der multivariaten Analyse wurde das Cox-Regressionsmodell verwendet. Die Time-to-Event Variablen wurden folgendermaßen definiert: Gesamtüberleben: OS (Overall Survival): Zeit von der ersten chirurgischen Intervention bis zum Tod (tumorabhängig und tumorunabhängig). Krankheitsspezifisches Überleben: DSS

(Disease Specific Survival): Zeit von der ersten chirurgischen Intervention bis zum krankheitsbedingten Tod. Rezidivfreies Überleben: RFS (Recurrence Free Survival): Zeit von der chirurgischen Resektion bis Rezidiv (lokal, regional oder Fernmetastase), oder Tod (tumorabhängig und tumorunabhängig). Metastasenfreies Überleben: MFS (Metastasis Free Survival) Zeit von der chirurgischen Intervention bis zur ersten Metastasierung (regional oder Fernmetastase) oder Tod (tumorabhängig und tumorunabhängig). Mit dem Spearman-Koeffizienten wurde die Korrelation zwischen zwei Biomarkern analysiert. Ergebnisse mit einem p-Wert $p \leq 0.05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Alle gemessenen Biomarker wurden mit klinischen Daten korreliert. Die Auswahl der Kategorien erfolgte im Hinblick auf eine Vergleichbarkeit mit den Arbeiten der Autoren Stankiewicz et al.(43), Azizi et al.(44), Chaux et al.(42). In die Auswertung floss der Zusammenhang der jeweiligen hohen und niedrigen Biomarkerexpression mit dem Primärtumor (pT1, pT2, pT3), Grading (G1/G2, G3/G4), Lymphknotenmetastasen (vorhanden, nicht vorhanden), Infektion mit dem HP-Virus (Infektion nachgewiesen, nicht nachgewiesen) und Alter (unter oder gleich 65 Jahre, über 65 Jahre). Der P-Wert wurde bei $p < 0.05$ als signifikant gewertet.

Ergebnisse

Tabelle 3 zeigt die Auswertung der klinischen Variablen. Das Alter der Erstdiagnose lag in diesem Patientenkollektiv im Median bei 67,0 Jahren. In der Altersverteilung waren 36 Patienten (47.4%) 65 Jahre oder jünger und 40 Patienten über 65 Jahre alt. Bei der Primäroperation wurden 8 Patienten (10.5%) beschnitten, bei 3 Patienten (3.9%) wurde eine Tumorexzision, bei 44 Patienten (57.9%) eine partielle Penektomie und bei 21 Patienten (27.6%) eine totale Penektomie durchgeführt. Das Tumorigradung wurde bei 59 Patienten (77.6%) als niedrig (G1 und G2) und bei 17 Patienten (22.4%) als hoch (G3 und G4) eingestuft. Die T-Stadien des Primärtumors waren bei 32 Patienten (42.1%) pT1, bei 26 Patienten (34.2%) pT2 und bei 18 Patienten pT3 (23.7%) klassifiziert worden. Weiterhin wurde bei 7 Patienten (21.9%) das Stadium pT1a und bei 2 Patienten (6.2%) pT1b angegeben, wohingegen bei 23 Patienten (71.9%) pT1a und pT1b nicht unterschieden werden konnte. Eine HPV-Infektion war bei 18 Patienten (23.7%) nachweisbar (in 16 Fällen HPV 16 und in zwei Fällen HPV 59). Dagegen waren 56 Patienten (73.7%) negativ für die getesteten HPV Stämme. Bei 2 Patienten war aus dem Probenmaterials keine Aussage zur HPV-Infektion möglich. Der p16^{INK4a} Status wurde bei 33 Patienten (46.1%) negativ und bei 38 Patienten (50,0%) positiv angegeben. Positiver p16^{INK4a} Status war mit dem Vorliegen einer High-Risk HPV Infektion assoziiert. Der Lymphknoten-Status wurde bei 62 Patienten (81.6%) mit NX-N0 und bei 4 Patienten (5.3%) mit N1 angegeben. N2 lag bei 7 Patienten (9.2%) und N3 bei 3 Patienten (3.9%) vor. Insgesamt zeigten 14 Patienten (18.4%) einen Lymphknotenbefall (pN1-3). Bei 18 Patienten (23.7%) trat ein Rezidiv auf, wohingegen bei 58 Patienten (76.3%) kein Rezidiv festgestellt wurde. Bei den Patienten mit Rezidiv zeigten 8 Patienten (10.5%) ein lokales -, 1 Patient (1.3%) ein regionales – und bei 9 Patienten (11.8%) eine Fernmetastasierung auf. Bei 18 Patienten (23,7%) wurde eine lymphovaskuläre Invasion festgestellt. Diese war dagegen bei 31 Patienten (40.8%) nicht vorliegend und bei 27 Patienten (35.5%) nicht ausgewertet. Der p16 Status war bei 35 Patienten (46.1%) negativ und bei 38 Patienten (50.0%) positiv.

Tabelle 3 Auswertung klinische Daten

Klinische Variable	Insgesamt (n=76)
Alter bei Erstdiagnose	
Mittelwert (SD)	64.1 (11.9)
Median [Min, Max]	67.0 [31.0, 86.0]
≤ 65	36 (47.4%)
> 65	40 (52.6%)
Chirurgische Therapie zu Beginn	
Zirkumzision	8 (10.5%)
Tumorexzision	3 (3.9%)
Partielle Penektomie	44 (57.9%)
Totale Penektomie	21 (27.6%)
Grading	
Niedrig (G1/G2)	59 (77.6%)
Hoch (G3/G4)	17 (22.4%)
pT- Stadium	
pT1	32 (42.1%)
pT2	26 (34.2%)
pT3	18 (23.7%)
pT1 Unterklassifizierung	
pT1a	7 (21.9%)
pT1b	2 (6.2%)
Unbekannt	23 (71.9%)
Lymphovaskuläre Infiltration	
Nein	31 (40.8%)
Ja	18 (23.7%)
Unbekannt	27 (35.5%)
HPV Infektion	
Negativ	56 (73.7%)
Positiv	18 (23.7%)
Unbekannt	2 (2.6%)
p16INK4a Status	
Negativ	35 (46.1%)
Positiv	38 (50.0%)
Unbekannt	3 (3.9%)
pN Stadium	
NX-0	62 (81.6%)
N1	4 (5.3%)
N2	7 (9.2%)
N3	3 (3.9%)
Rezidiv	
Nein	58 (76.3%)
Ja	18 (23.7%)
Rezidiv Lokalisation	
Kein	58 (76.3%)
Lokal	8 (10.5%)
Regional	1 (1.3%)
Entfernt	9 (11.8%)
Weitere Therapie	
Keine	60 (78.9%)
Chemotherapie	13 (17.1%)
Bestrahlung	1 (1.3%)
Chemotherapie und Bestrahlung	2 (2.6%)
Tumorabhängiger Tod	
Nein	68 (89.5%)
Ja	8 (10.5%)

Biomarkerauswertung

Der IRS Schwellenwert (Cut-off) wurde für panAkt mit 4.75, für pAkt mit 0.75, für pmTOR mit 1.25, für pS6 mit 1.25, für p4EBP1 mit 6.25, für pRAS mit 0.75 und für pp70S6K mit 0.25, für mTOR mit 1.25 und für S6k1 mit 0.25 berechnet. Tabelle 4 zeigt die jeweiligen IRS Cut-offs der Biomarker.

Tabelle 4 IRS Cut-off

Biomarker	IRS cut-off
panAkt	4.75
pAkt	0.75
pmTOR	1.25
pS6	1.25
p4EBP1	6.25
pRAS	0.75
pp70S6K	0.25
mTOR	1.25
S6K1	0.25

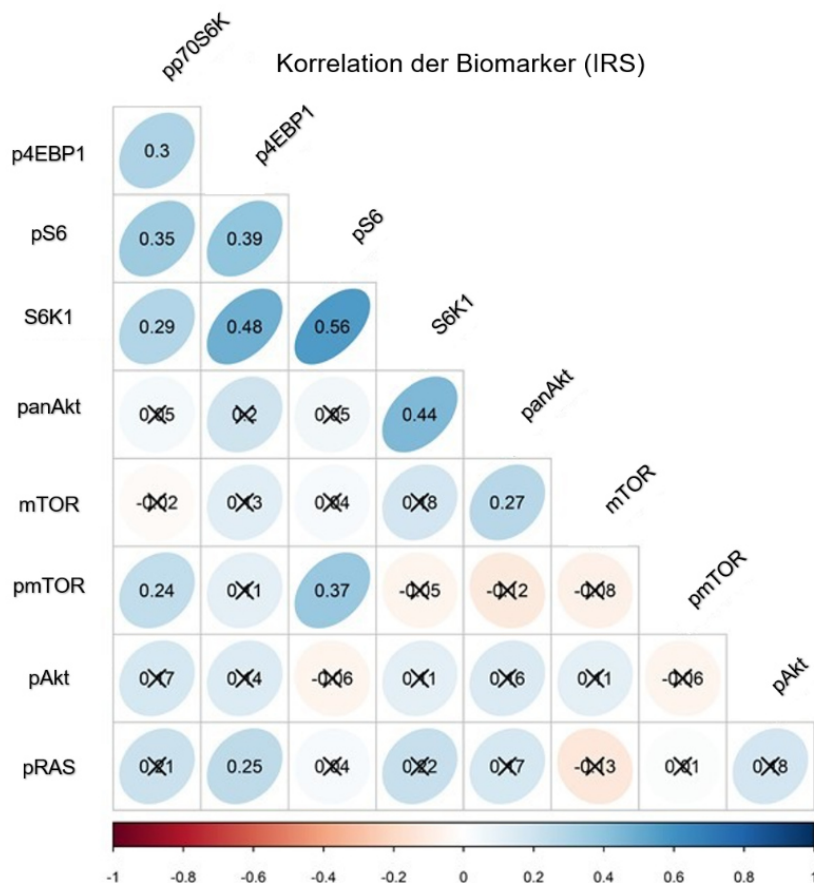
Die Ergebnisse der Biomarkerauswertung sind in der Tabelle 5 aufgeführt. Bei panAkt konnte bei 64 Patienten (84.2%) eine niedrige und bei 10 Patienten (13.2%) eine hohe Expression im Tumorgewebe gemessen werden. Bei 2 Patienten ließen sich die Daten nicht auswerten. Der Biomarker pAkt war bei 20 Patienten (26.6%) niedrig und bei 53 Patienten (69.7%) vermehrt exprimiert. Bei 3 Patienten konnte pAkt nicht ausgewertet werden. Bei mTOR zeigten 58 Patienten (76.3%) erniedrigte, 15 Patienten (19.7%) erhöhte und 3 Patienten (3.9%) eine unklare Expression. Bei 54 Patienten (71.1%) zeigte sich pmTOR erniedrigt, wohingegen bei 21 Patienten (27.6%) eine erhöhte Expression registriert wurde. Für 1 Patient (1.3%) war hier keine Auswertung möglich. Bei pS6 zeigte sich bei 50 Patienten (65.8%) eine erhöhte und bei 23 Patienten (30.3%) eine niedrige Expression. Bei 10 Patienten (13.2%) war p4EBP1, bei 26 Patienten (34.2%) pp70S6K, bei 5 Patienten (6.6 %) pRAS und bei 44 Patienten (57.9%) s6K1 erhöht.

Tabelle 5 Biomarker – Ergebnisse

Biomarker	Insgesamt (n=76)
panAkt	
Niedrige Expression	64 (84.2%)
Hohe Expression	10 (13.2%)
Nicht auswertbar	2 (2.6%)
pAkt	
Niedrige Expression	20 (26.3%)
Hohe Expression	53 (69.7%)
Nicht auswertbar	3 (3.9%)
mTOR	
Niedrige Expression	58 (76.3%)
Hohe Expression	15 (19.7%)
Nicht auswertbar	3 (3.9%)
pmTOR	
Niedrige Expression	54 (71.1%)
Hohe Expression	21 (27.6%)
Nicht auswertbar	1 (1.3%)
pS6	
Niedrige Expression	23 (30.3%)
Hohe Expression	50 (65.8%)
Nicht auswertbar	3 (3.9%)
p4EBP1	
Niedrige Expression	63 (82.9%)
Hohe Expression	10 (13.2%)
Nicht auswertbar	3 (3.9%)
pp70S6K	
Niedrige Expression	47 (61.8%)
Hohe Expression	26 (34.2%)
Nicht auswertbar	3 (3.9%)
S6K1	
Niedrige Expression	3 (3.9%)
Hohe Expression	44 (57.9%)
Nicht auswertbar	29 (38.2%)
pPRAS	
Niedrige Expression	71 (93.4%)
Hohe Expression	5 (6.6%)

Die Biomarker wurden auf ihre Beziehung zueinander getestet. In der Abbildung 7 sind diese Beziehungen graphisch in einem Korrelogramm dargestellt. Eine positive Korrelation zeigt sich mit blauer Farbe (negative Korrelation wurde mit roter Farbe angezeigt). Je intensiver die Farbe ist, desto stärker ist die Assoziation. Durchgestrichene Werte zeigen keine signifikante Korrelation dieser Kombination an. Dabei zeigte panAkt keine Korrelation mit der phosphorylierten Form pAkt. Auch bei mTOR ließ sich zur phosphorylierten Variante keine Korrelation nachweisen. Für S6K1 konnte eine positive Korrelation mit Akt ($p=0.002$), p4EBP1 ($p=0.001$) und pS6 ($p<0.001$) gezeigt werden. pS6 war mit pmTOR ($p=0.001$), pp70S6K ($p=0.003$) und p4EBP1 ($p=0.001$) assoziiert.

Abb. 7 Korrelogramm der Biomarker

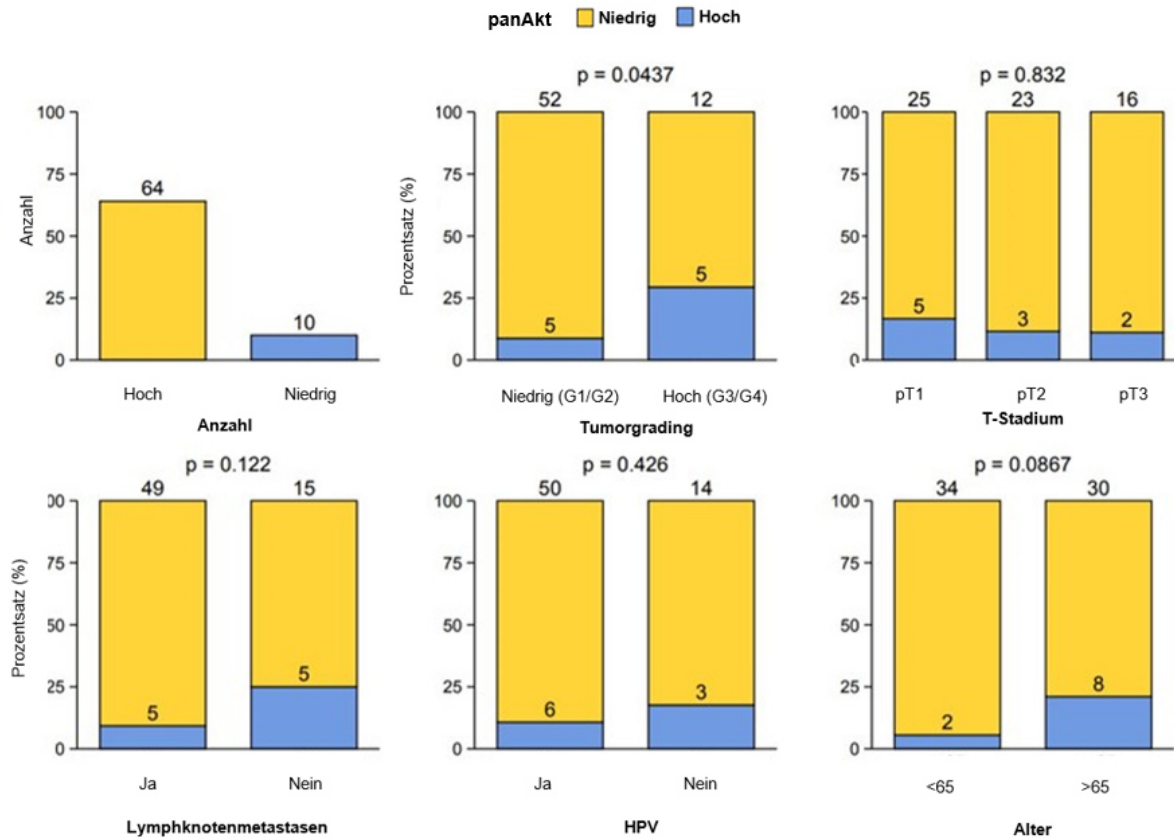


Korrelation der Biomarker mit den klinischen Daten

Bei der Tumordifferenzierung (Grading) konnte eine signifikante Erhöhung der panAkt Expression ($p=0.0437$) bei High-Grade Tumoren (G3/G4) nachgewiesen werden. Dagegen waren pT-Stadium, Lymphknotenmetastasierung, und HPV- Infektion

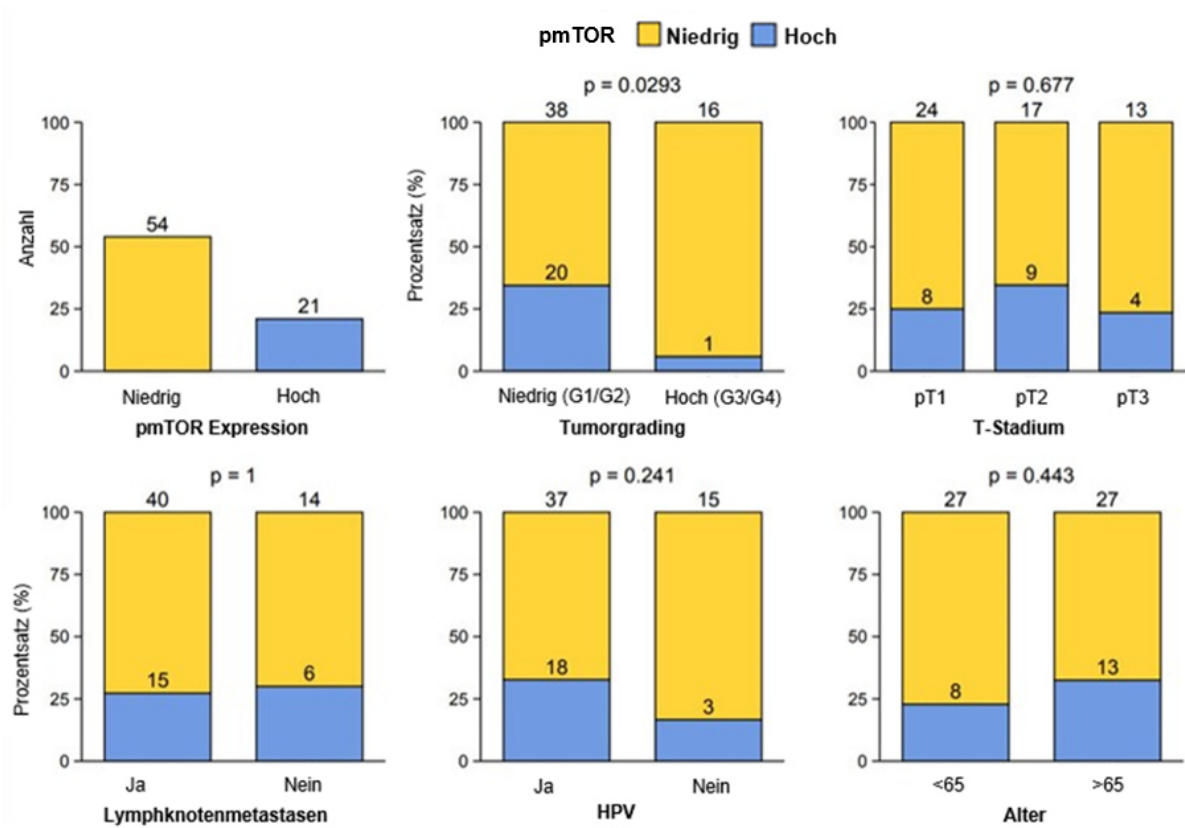
unabhängig zu panAkt. Ein Trend zeigte sich für die Korrelation von erhöhter Expression von panAkt bei Patienten über 65 Jahren ($p=0.0867$). Die Ergebnisse für panAkt sind in der Abbildung 8 im Schaubild dargestellt.

Abb. 8 Korrelation der Expression von panAkt mit klinischen und histologischen Parametern



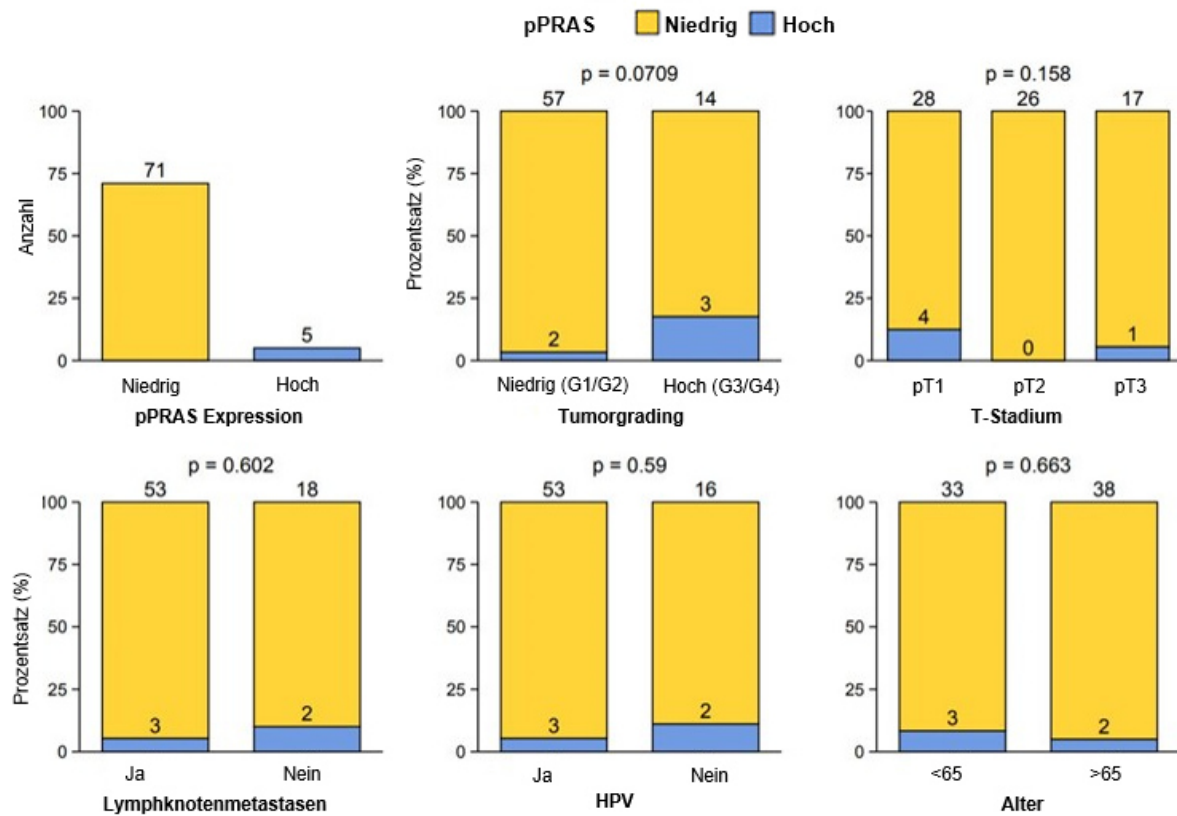
Ein signifikanter Zusammenhang zeigte sich auch bei niedriger pmTOR Expression in High-Grade Tumoren (G3/G4) ($p=0.0293$). In den übrigen Kategorien konnte kein Zusammenhang auf dem Signifikanzniveau nachgewiesen werden. Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse im Schaubild.

Abb. 9 Korrelation der Expression von pmTOR mit klinischen und histologischen Parametern



Es zeigt sich ein Trend, dass eine erhöhte Konzentration von pPRAS bei High-Grade Tumoren zu finden ist ($p=0.07$). Bei der primären TumorgroÙe, Lymphknotenmetastasen, HPV-Infektion und Alter über 65 Jahre, konnte kein signifikanter Zusammenhang gefunden werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 im Schaubild dargestellt.

Abb. 10 Korrelation der Expression von pPRAS mit klinischen und histologischen Parametern



Die Biomarker mTOR (Abb. 11), pAkt (Abb. 12), pS6 (Abb. 13), p4EBP1 (Abb. 14), pp70S6K1 (Abb. 15) und S6K1 (Abb. 16) zeigten univariat keine Korrelation in den Kategorien Grading, pT-Stadium, Lymphknotenmetastasen, HPV Infektion und Alter über 65 Jahre.

Abb. 11 Korrelation der Expression von mTOR mit klinischen und histologischen Parametern

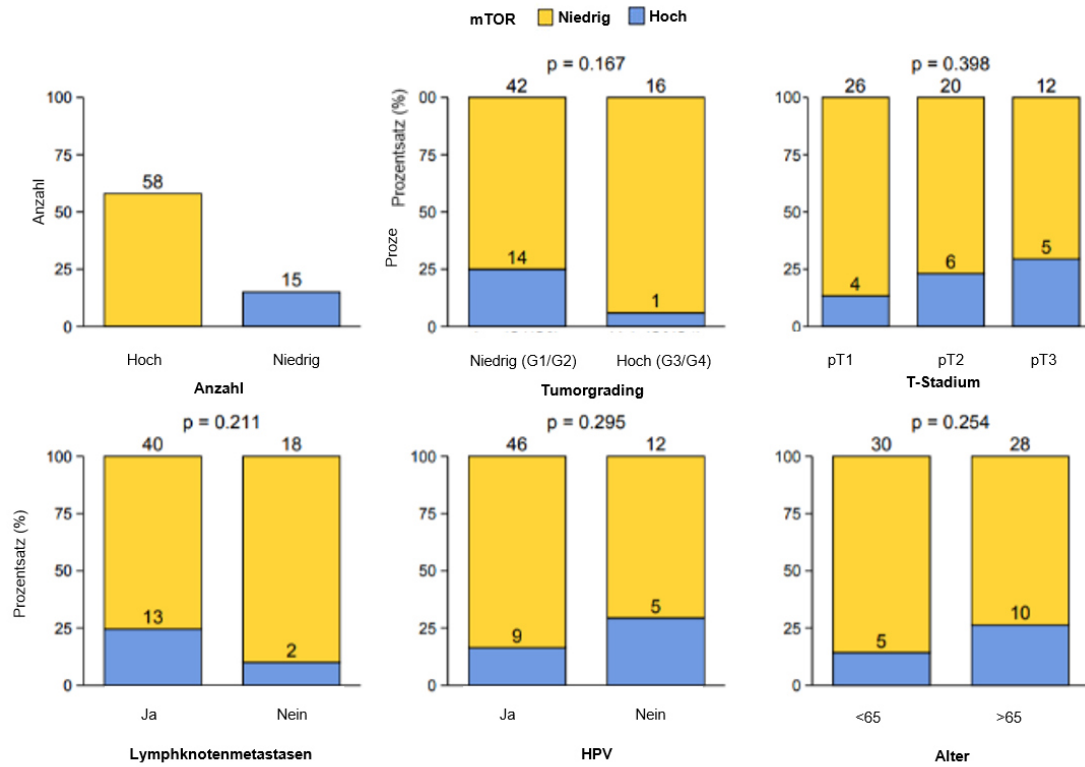


Abb. 12 Korrelation der Expression von pAkt mit klinischen und histologischen Parametern

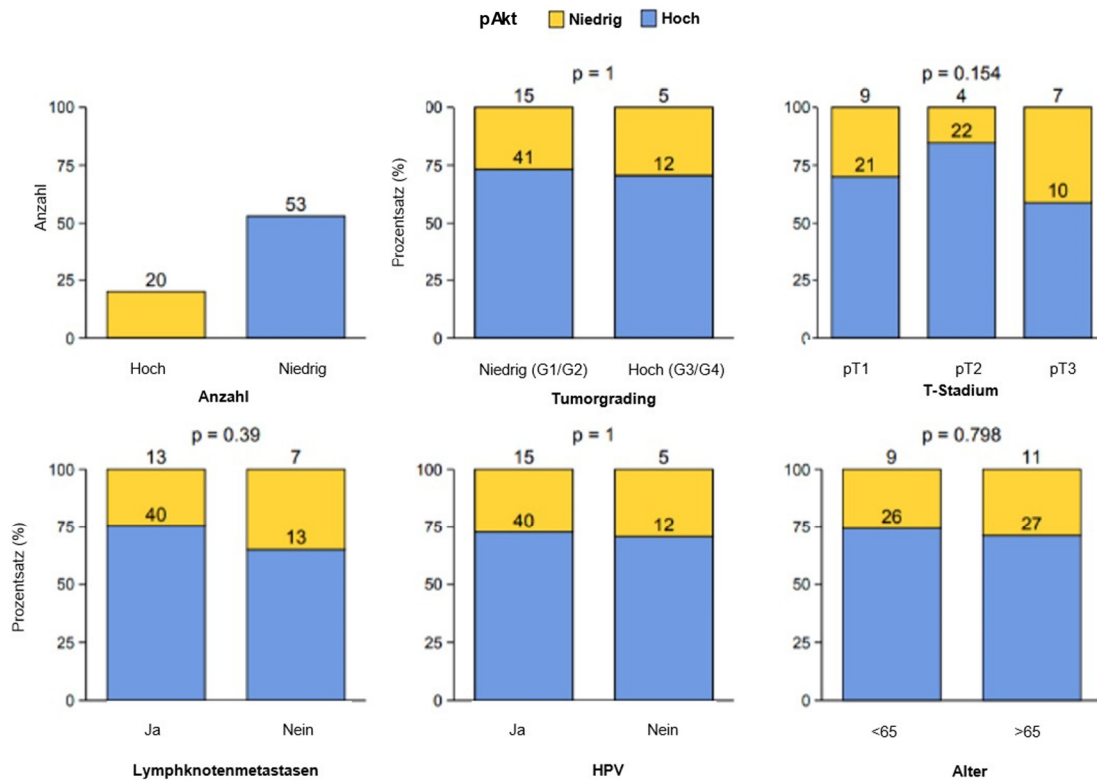


Abb. 13 Korrelation der Expression von pS6 mit klinischen und histopathologischen Parametern

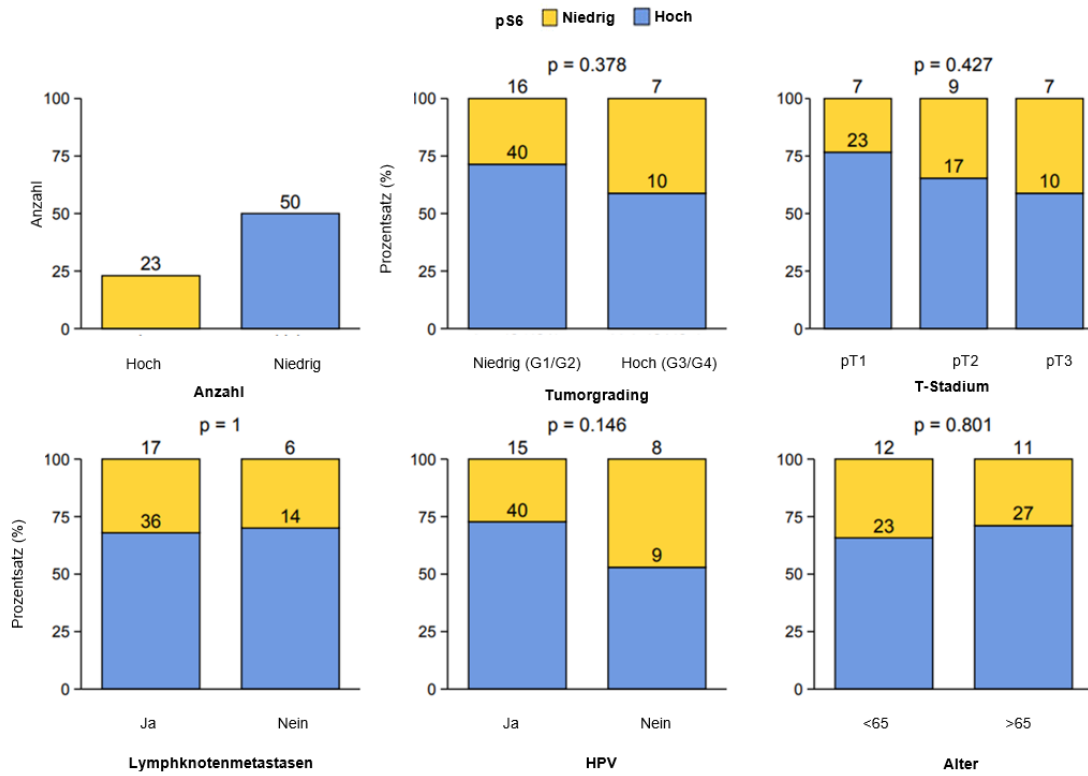


Abb. 14 Korrelation der Expression von p4EBP1 mit klinischen und histopathologischen Parametern

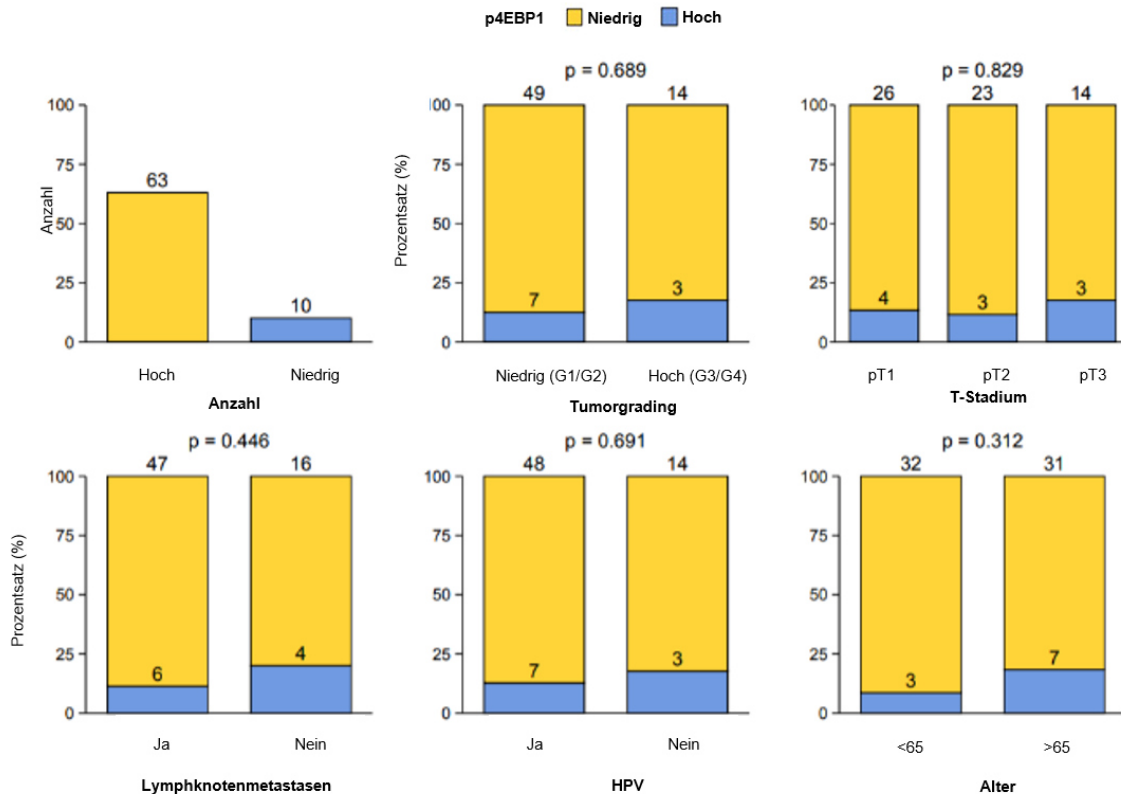


Abb. 15 Korrelation der Expression von pp70S6K mit klinischen und histopathologischen Parametern

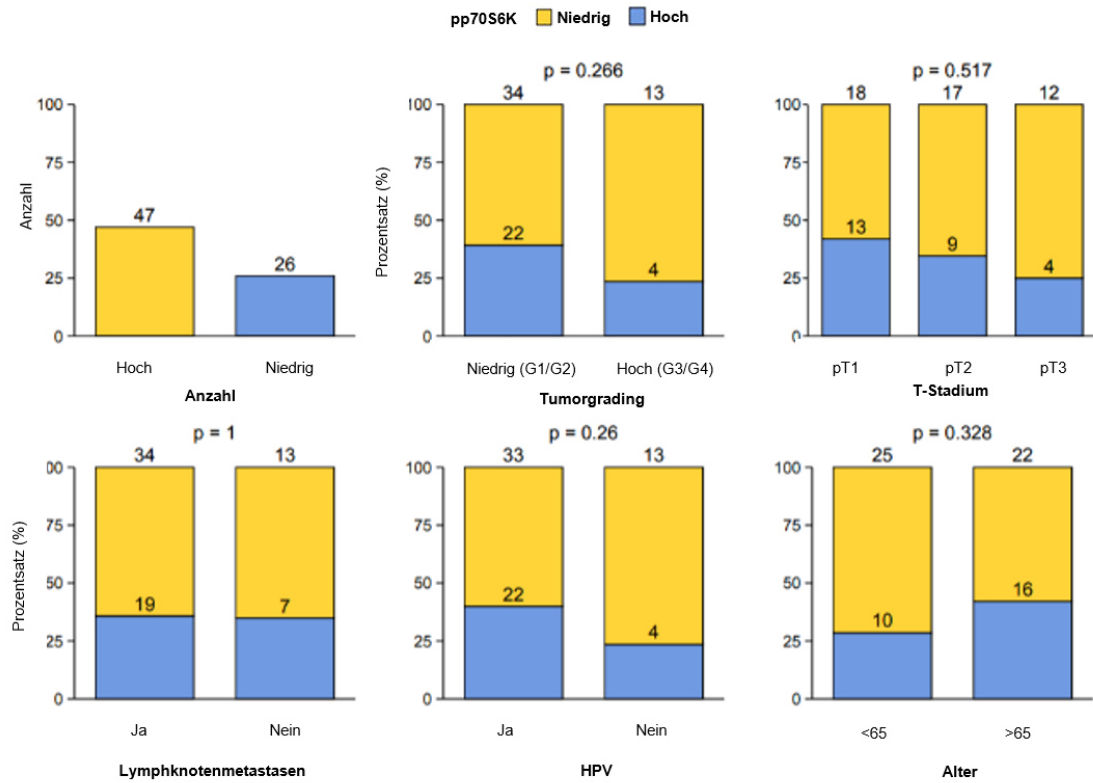
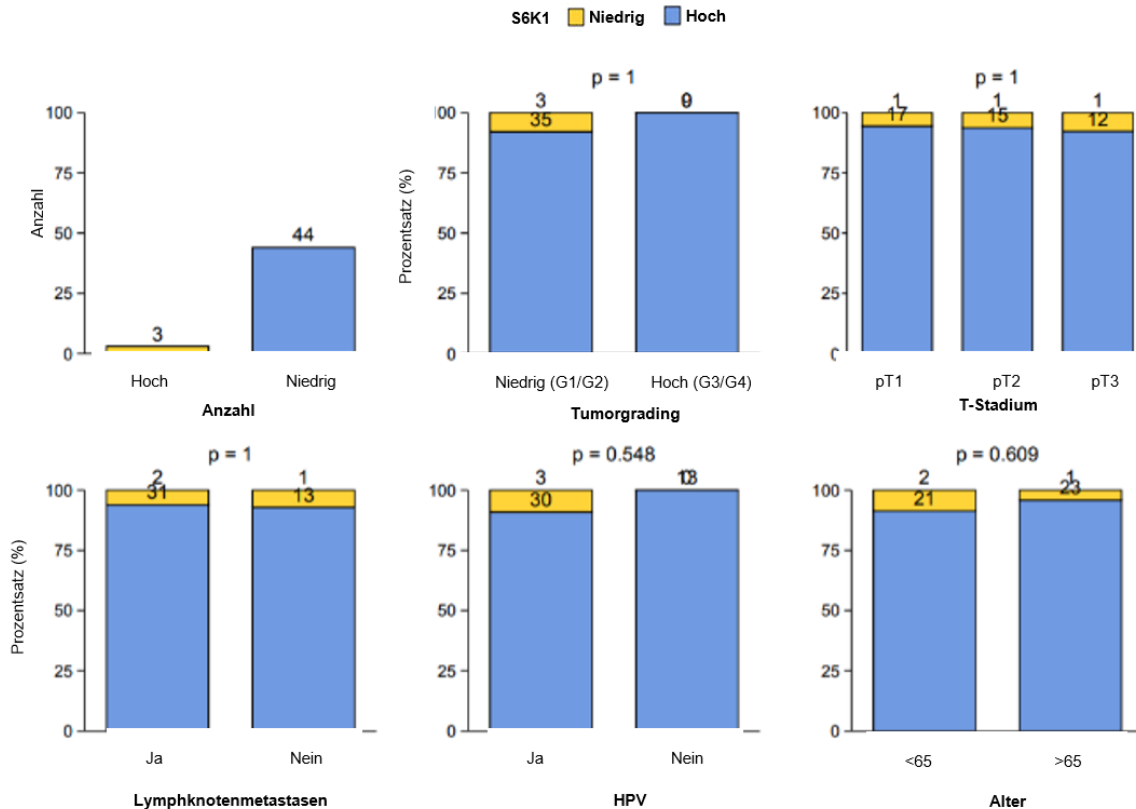


Abb. 16 Korrelation der Expression von S6K1 mit klinischen und histopathologischen Parametern



Univariate Überlebensanalyse

Der Follow-Up Zeitraum der gesamten Kohorte lag im Median bei 34,1 Monaten. Im betrachteten Zeitraum starben 23 Patienten (30,3%). Acht Patienten starben tumorabhängig (10,5%). Bei 18 Patienten (23,7%) trat ein Rezidiv auf. Dabei lag bei acht Patienten (10,5%) ein lokales Rezidiv vor. Regionale Rezidive, wurden bei einem Patienten (1,3%) und Fernmetastasierung bei neun Patienten (11,8%) festgestellt. Der mediane Zeitraum von der ersten chirurgischen Intervention bis zum Auftreten eines Rezidivs betrug 7.6 Monate. 11 Patienten (14,5%) erhielten eine adjuvante Chemotherapie. Bei fünf Patienten (6,6%) wurde eine palliative Therapie durchgeführt. Dabei erhielten 2 Patienten (2,6 %) eine kombinierte Radiochemotherapie. 3 Patienten erhielten alleinig Chemotherapie und 1 Patient (1,3%) wurde palliativ bestrahlt. Mit Blick auf die klinischen Parameter zeigte sich ein Risiko für ein schlechteres krankheitsspezifisches Überleben bei Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen Hazard Ratio (HR) 28.12, 95% Konfidenzintervall (3.39-232.94), $p=0.002$. Die Überlebenskurve ist in der Abbildung 17 im Kaplan-Meier Diagramm gezeigt.

Abb. 17 Zusammenhang zwischen Lymphknotenmetastasen und dem krankheitsspezifischen Überleben in der Kaplan-Meier Überlebenskurve (univariat).

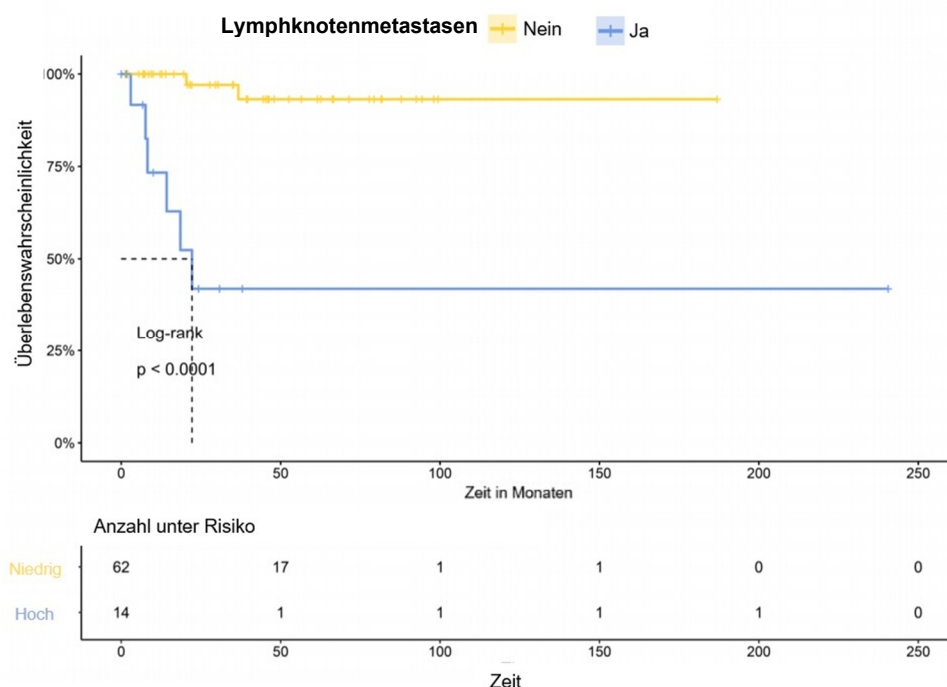


Tabelle 6 Zusammenhang zwischen der Biomarkerexpression und dem Gesamtüberleben (Hazard Ratio der univariaten Cox-Regression).

Variable			Hazard Ratio (95% - Konfidenzintervall)	p
panAKT	niedrig	64	Referenz	
	hoch	10	2.72 (0.98, 7.53)	0.05
pAKT	niedrig	20	Referenz	
	hoch	53	1.09 (0.39, 3.04)	0.87
pmTOR	niedrig	54	Referenz	
	hoch	21	0.76 (0.30, 1.93)	0.56
pS6	niedrig	23	Referenz	
	hoch	50	2.32 (0.77, 6.95)	0.13
p4EBP1	niedrig	63	Referenz	
	hoch	10	1.73 (0.63, 4.78)	0.29
pp70S6K	niedrig	47	Referenz	
	hoch	26	0.82 (0.34, 1.99)	0.66
mTOR	niedrig	58	Referenz	
	hoch	15	0.78 (0.26, 2.33)	0.65
S6K1	niedrig	3	Referenz	
	hoch	44	3.31 (0.41, 26.93)	0.26
pPRAS	niedrig	71	Referenz	
	hoch	5	1.04 (0.24, 4.49)	0.95
p16	negativ	35	Referenz	
	positiv	38	1.09 (0.47, 2.56)	0.84

Tabelle 7 Zusammenhang zwischen der Biomarkerexpression und dem krankheitsspezifischen Überleben (Hazard Ratio der univariaten Cox-Regression).

Variable			Hazard Ratio (95% - Konfidenzintervall)	p
panAKT	niedrig	64	Referenz	
	hoch	10	6.14 (1.39, 27.06)	0.02
pAKT	niedrig	20	Referenz	
	hoch	53	2.72 (0.33, 22.14)	0.35
pmTOR	niedrig	54	Referenz	
	hoch	21	3.52 (0.84, 14.75)	0.09
pS6	niedrig	23	Referenz	
	hoch	50	307677651.77 (0.00, Inf)	1.0
p4EBP1	niedrig	63	Referenz	
	hoch	10	4.17 (1.00, 17.50)	0.05
pp70S6K	niedrig	47	Referenz	
	hoch	26	0.82 (0.20, 3.44)	0.79
mTOR	niedrig	58	Referenz	
	hoch	15	0.00 (0.00, Inf)	1.00
S6K1	niedrig	3	Referenz	
	hoch	44	77909995.41 (0.00, Inf)	1.00
pPRAS	niedrig	71	Referenz	
	hoch	5	1.71 (0.21, 13.91)	0.62
p16	negativ	35	Referenz	
	positiv	38	0.71 (0.17, 2.96)	0.63

Tabelle 8 Zusammenhang zwischen der Biomarkerexpression und dem rezidivfreien Überleben (Hazard Ratio der univariaten Cox-Regression).

Variable			Hazard Ratio (95% - Konfidenzintervall)	p
panAKT	niedrig	64	Referenz	
	hoch	10	0.87 (0.20, 3.76)	0.9
pAKT	niedrig	20	Referenz	
	hoch	53	0.66 (0.27, 1.62)	0.4
pmTOR	niedrig	54	Referenz	
	hoch	21	0.60 (0.22, 1.63)	0.3
pS6	niedrig	23	Referenz	
	hoch	50	1.52 (0.62, 3.74)	0.4
p4EBP1	niedrig	63	Referenz	
	hoch	10	1.90 (0.64, 5.61)	0.2
pp70S6K	niedrig	47	Referenz	
	hoch	26	0.51 (0.21, 1.24)	0.1
mTOR	niedrig	58	Referenz	
	hoch	15	0.63 (0.21, 1.86)	0.4
S6K1	niedrig	3	Referenz	
	hoch	44	1.71 (0.37, 8.01)	0.5
pPRAS	niedrig	71	Referenz	
	hoch	5	0.38 (0.05, 2.87)	0.4
p16	negativ	30	Referenz	
	positiv	36	1.10 (0.48, 2.51)	0.8

Tabelle 9 Zusammenhang zwischen der Biomarkerexpression und dem metastasenfremen Überleben (Hazard Ratio der univariaten Cox-Regression).

Variable			Hazard Ratio (95% - Konfidenzintervall)	p
panAKT	niedrig	64	Referenz	
	hoch	10	3.48 (0.87, 13.89)	0.08
pAKT	niedrig	20	Referenz	
	hoch	53	1.58 (0.33, 7.46)	0.57
pmTOR	niedrig	54	Referenz	
	hoch	21	2.27 (0.66, 7.84)	0.20
pS6	niedrig	23	Referenz	
	hoch	50	1.76 (0.37, 8.31)	0.48
p4EBP1	niedrig	63	Referenz	
	hoch	10	1.73 (0.63, 4.78)	0.08
pp70S6K	niedrig	47	Referenz	
	hoch	26	3.41 (0.88, 13.22)	0.43
mTOR	niedrig	58	Referenz	
	hoch	15	0.00 (0.00, Inf.)	1.0
S6K1	niedrig	3	Referenz	
	hoch	44	76648623.89 (0.00, Inf.)	1.0
pPRAS	niedrig	71	Referenz	
	hoch	5	1.26 (0.16, 9.93)	0.83
p16	negativ	35	Referenz	
	positiv	38	0.76 (0.21, 2.70)	0.67

panAkt

In der univariaten Cox-Regression zeigte eine erhöhte panAkt Expression einen Trend für ein erhöhtes Risiko für ein schlechteres Outcome im Hinblick auf das Gesamtüberleben (OS) HR 2.72, 95% Konfidenzintervall (0.98 – 7.53), $p=0.05$. Die Tab. 6 zeigt den Zusammenhang zwischen der Biomarkerexpression und dem Gesamtüberleben. Eine erhöhte panAkt Expression war auch mit einem verschlechterten krankheitsspezifischen Überleben (DSS) assoziiert HR 6.14, 95% Konfidenzintervall (1.39 – 27.06), $p=0.02$. In Tab. 7 ist der Zusammenhang zwischen krankheitsspezifischen Überleben und der Biomarkerexpression aufgeführt. Die Biomarkerexpression zeigte keinen Zusammenhang mit dem Outcome beim rezidivfreien- (siehe Tab. 8) und metastasenfreien Überleben (siehe Tab. 9). Eine erhöhte panAkt Expression stand ebenfalls mit einem reduzierten Gesamtüberleben ($p=0.045$) im Zusammenhang. Die Abbildung 18 zeigt das entsprechende Kaplan-Meier Diagramm. Ein erhöhtes panAkt korrelierte auch signifikant mit einem schlechteren krankheitsspezifischen Überleben ($p=0.0066$). Die Abbildung 19 zeigt das Kaplan-Meier Diagramm von panAkt mit Blick auf das DSS.

Abb. 18 Zusammenhang zwischen der Expression von panAkt und dem Gesamtüberleben in der Kaplan-Meier Überlebenskurve (univariat).

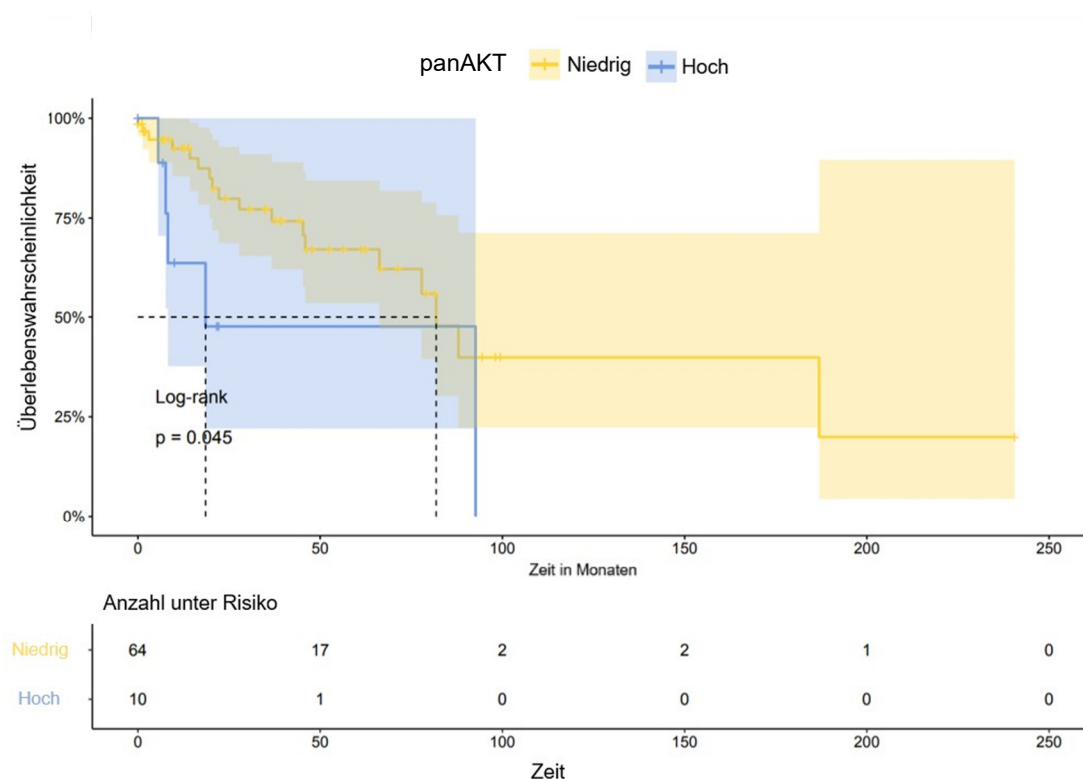
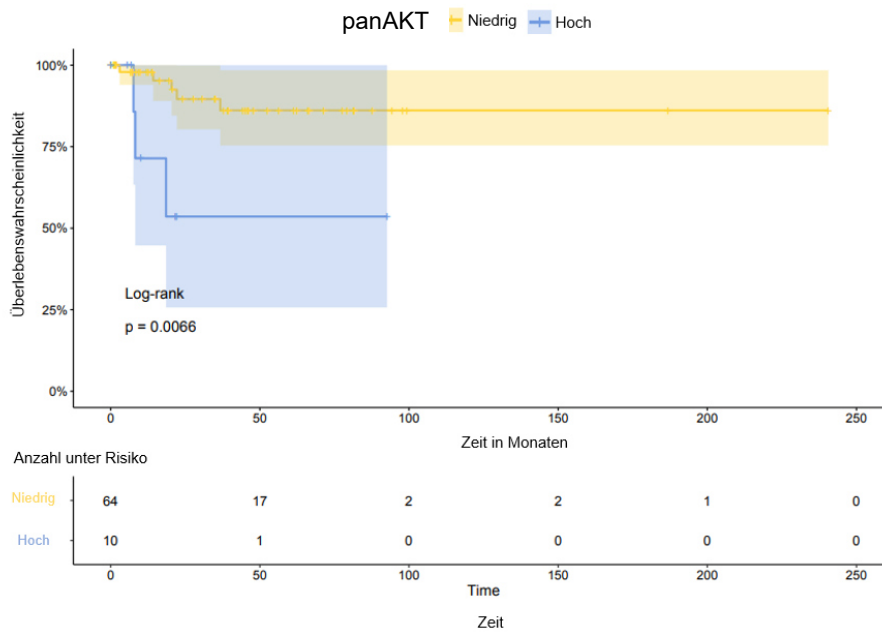
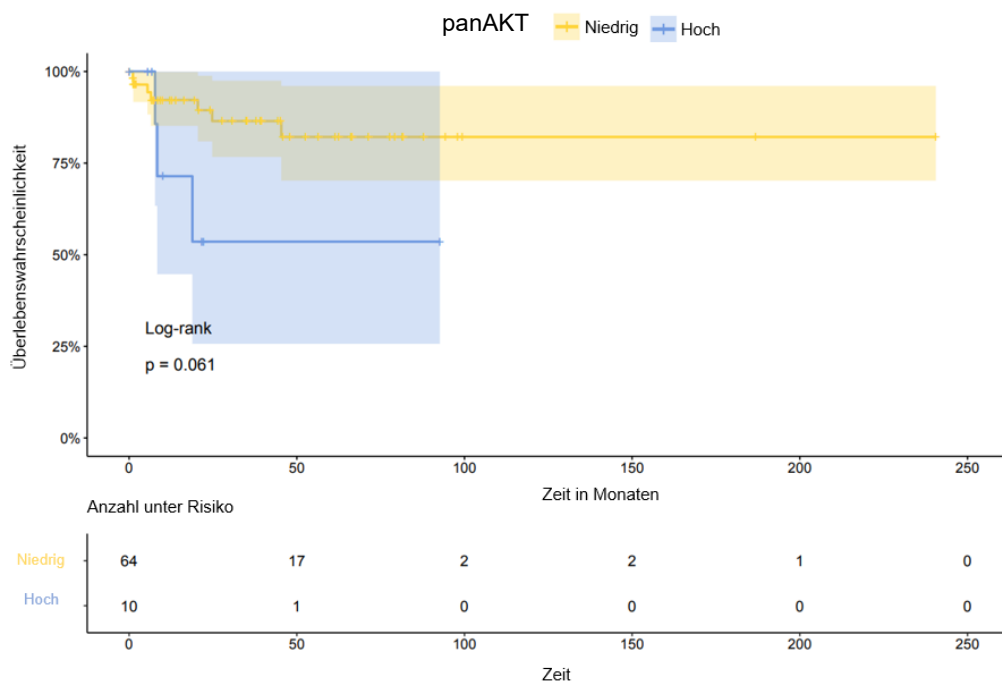


Abb. 19 Zusammenhang zwischen der Expression von panAkt und dem krankheitsspezifischen Überleben in der Kaplan-Meier Überlebenskurve (univariat).



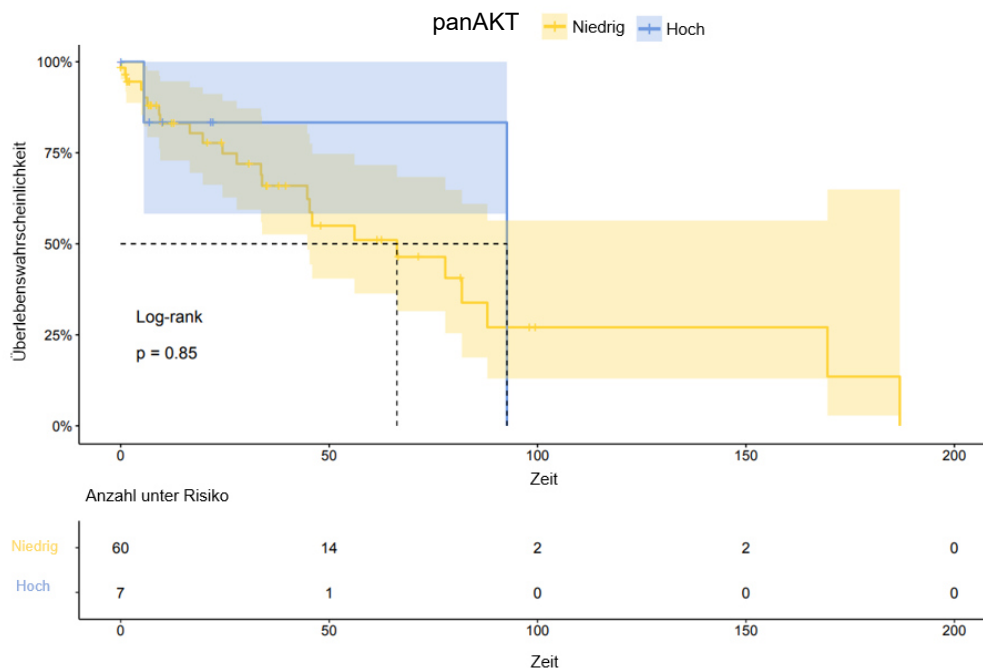
Weiterhin zeigte sich für panAkt ein Trend, dass eine erhöhte Expression des Biomarkers mit einem schlechteren metastasenfreien Überleben (MFS) einhergeht ($p=0.061$). Das metastasenfreie Überleben ist in der Abbildung 20 im Kaplan-Meier Diagramm für panAkt gezeigt.

Abb. 20 Zusammenhang zwischen der Expression von panAkt und dem metastasenfreien Überleben in der Kaplan-Meier Überlebenskurve (univariat).



Mit Blick auf das rezidivfreie Überleben (RFS) zeigte sich kein Zusammenhang mit hoher oder niedriger panAkt Expression. Die Abb. 21 zeigt die Kaplan-Meier Überlebenskurve des rezidivfreien Überlebens von panAkt.

Abb. 21 Zusammenhang zwischen der Expression von panAkt und dem rezidivfreien Überleben in der Kaplan-Meier Überlebenskurve (univariat).



p4EBP1

Das Protein p4EBP1 war bei hoher Expression mit einem reduzierten krankheitsspezifischen Überleben in der Cox-Regression assoziiert (siehe Tab. 7) HR 4.17, 95% Konfidenzintervall (0.1 – 17.5), $p=0.05$. Die erhöhte p4EBP1 Expression führte auch im Kaplan-Maier-Test zu einem verschlechterten krankheitsspezifischen Überleben ($p=0.034$). Dies ist in Abb. 22 im Kaplan-Meier-Schaubild dargestellt. Es zeigte sich auch ein Trend, dass eine erhöhte Expression von p4EBP1 mit einem schlechterem metastasenfreien Überleben (MFS) einherging ($p=0.06$). Die Überlebenskurve des MFS von p4EBP1 ist in Abb. 23 dargestellt. Die p4EBP1 Expression zeigte dagegen in der univariaten Cox-Regression keinen Zusammenhang mit dem Gesamt- (Abb. 24) und rezidivfreien Überleben (Abb. 25) im Kaplan-Maier-Test.

Abb. 22 Zusammenhang zwischen der Expression von p4EBP1 und dem krankheitsspezifischen Überleben in der Kaplan-Meier Überlebenskurve (univariat).

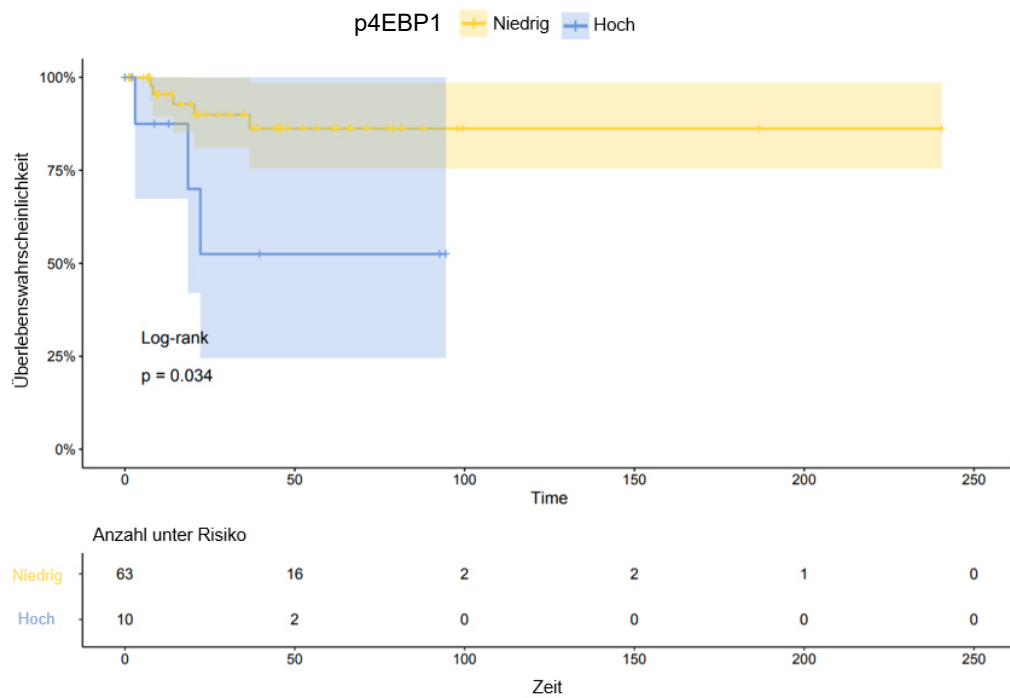


Abb. 23 Zusammenhang zwischen der Expression von p4EBP1 und dem metastasenfremen Überleben in der Kaplan-Meier Überlebenskurve (univariat).

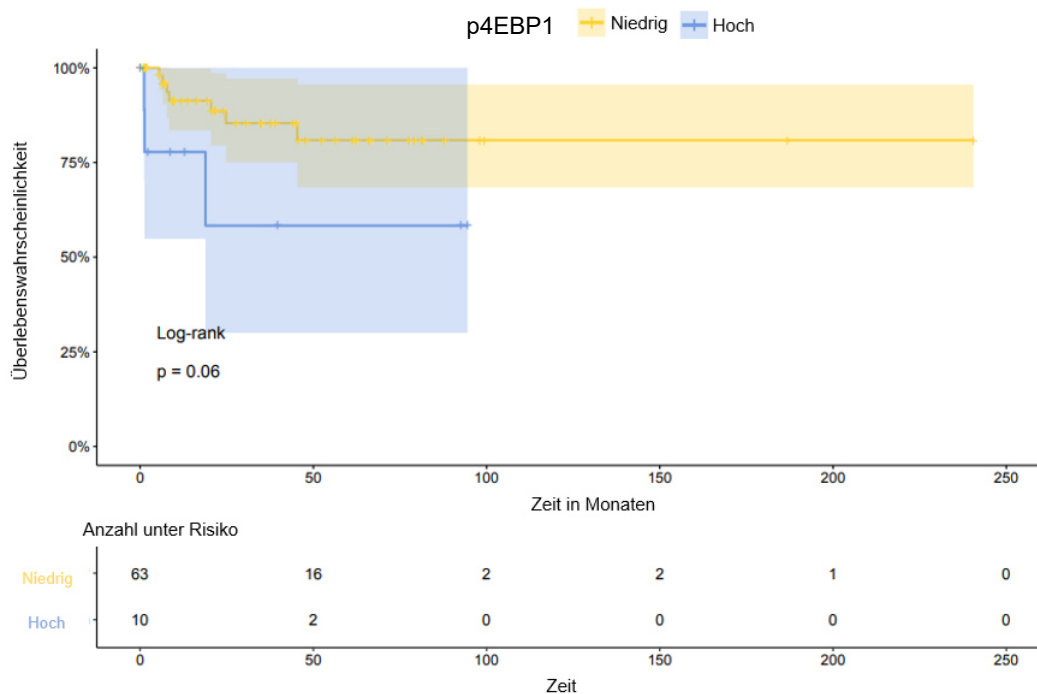


Abb. 24 Zusammenhang der Expression von p4EBP1 und dem Gesamtüberleben in der Kaplan-Meier Überlebenskurve (univariat).

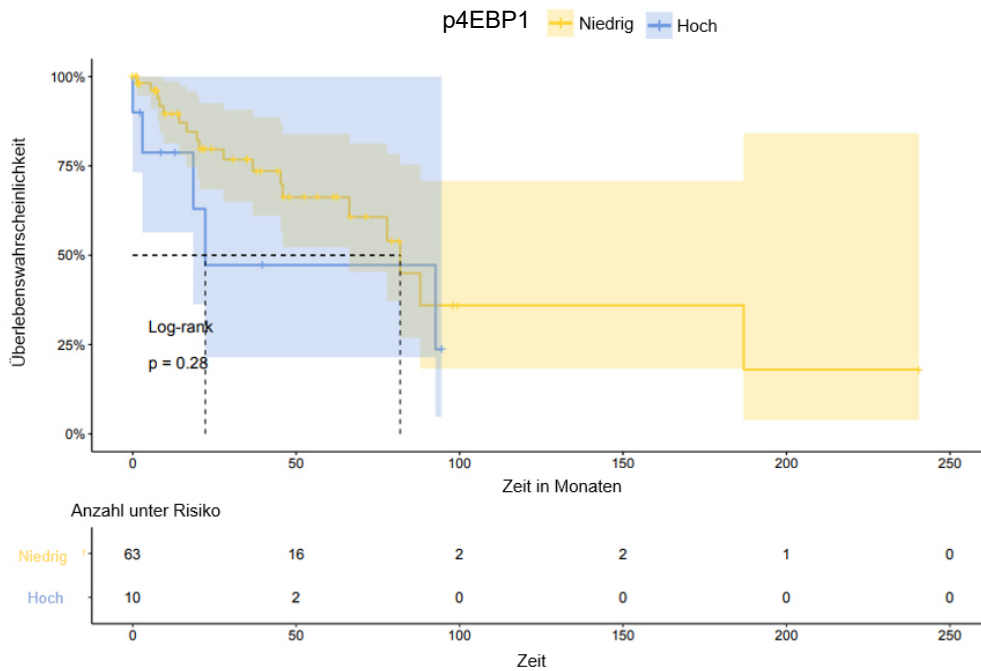
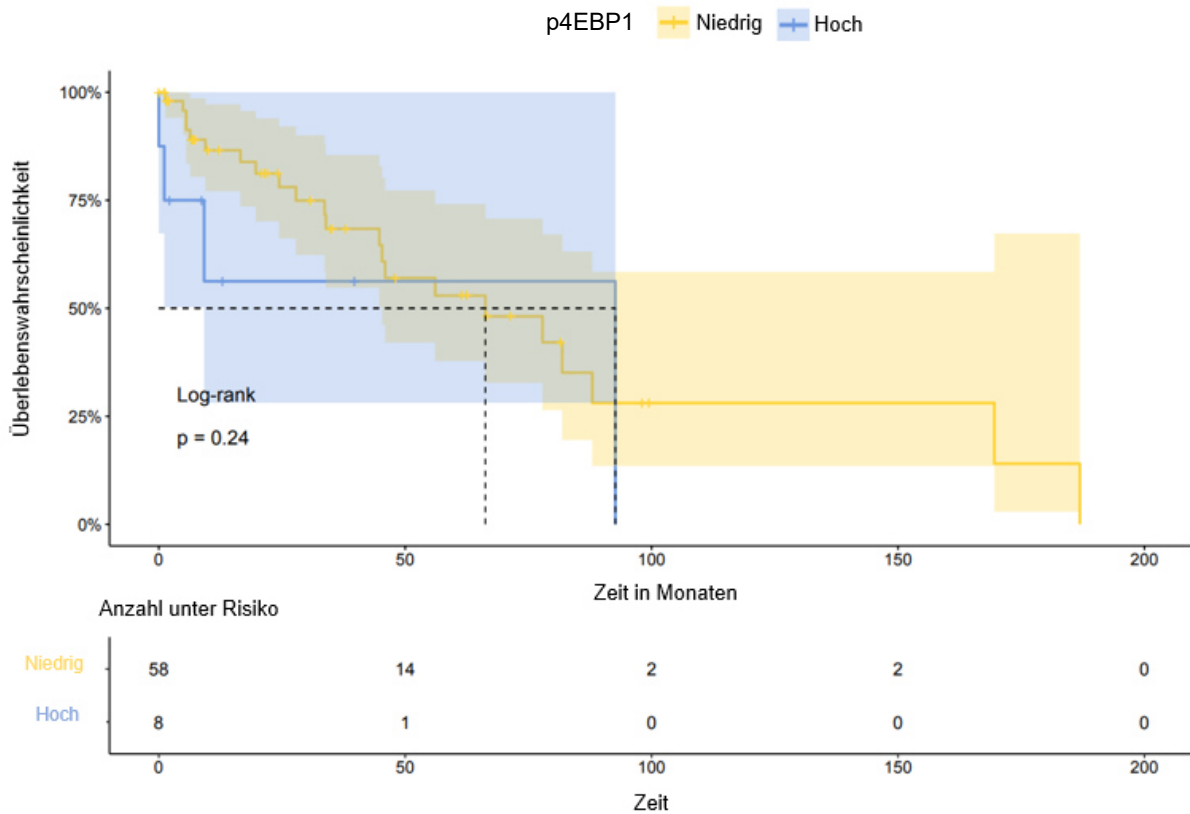


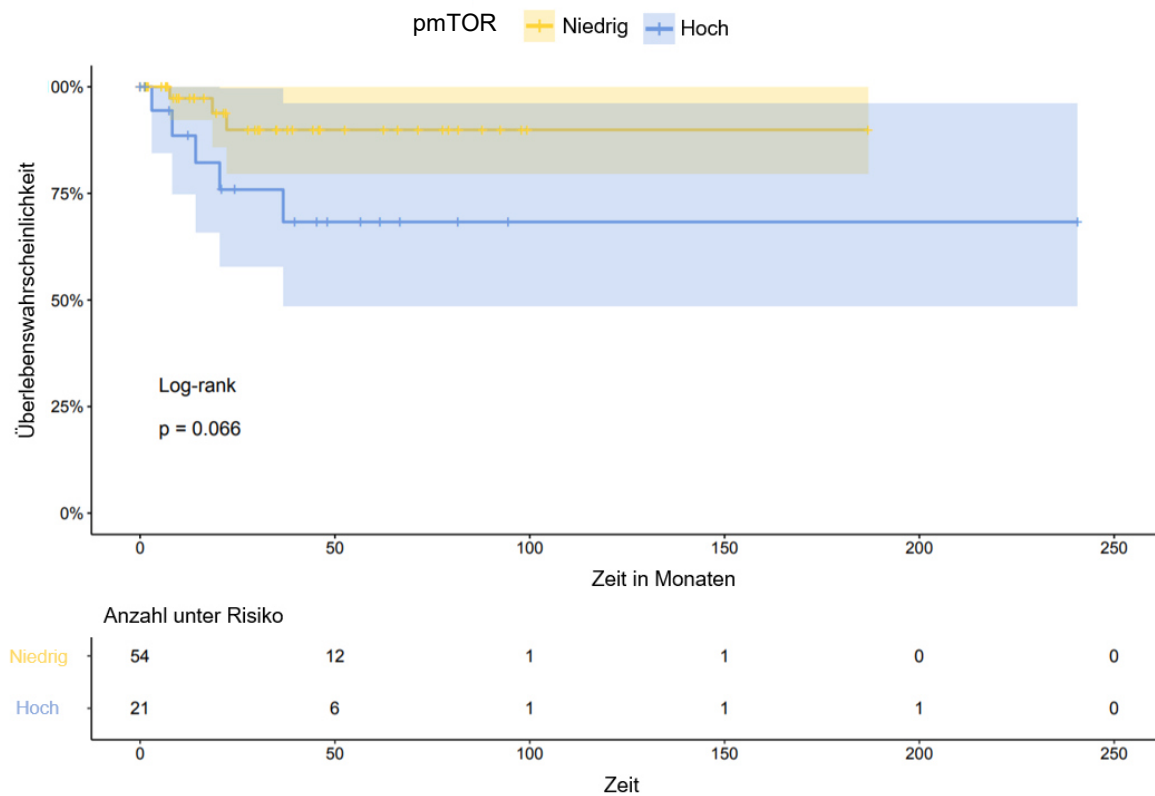
Abbildung 25 Zusammenhang zwischen der Expression von p4EBP1 und dem rezidivfreien Überleben in der Kaplan-Meier Überlebenskurve (univariat).



pmTOR

Ein Trend zeigte sich bei pmTOR in Bezug auf ein vermindertes krankheitsspezifischen Überleben bei Patienten mit höheren Expressionen (siehe Tab. 7) HR 3.52, 95% Konfidenzintervall (0.84 – 14.7) $p=0.09$. Dies wird in Abb. 26 in der Kaplan-Meier Überlebenskurve dargestellt ($p=0.066$). Im Übrigen zeigte sich für die Expression von pmTOR in der univariaten Cox-Regression kein Zusammenhang mit dem Gesamt-, rezidivfreien und metastasenfremen Überleben.

Abb. 26 Zusammenhang der Expression von pmTOR und dem krankheitsspezifischen Überleben in der Kaplan-Meier Überlebenskurve (univariat).



Multivariate Überlebensanalyse

Die Ergebnisse der multivariaten Cox-Regression sind in der Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10 Multivariate Cox-Regression der Biomarkereexpression, klinischen und histopathologischen Parametern.

Kategorie	Gesamtüberleben (OS)		Krankheitsspezifisches Überleben (DSS)		Rezidivfreies Überleben (RFS)		Metastasenfreies Überleben (MFS)	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Alter bei Diagnose							(1.00 Referenz)	
≤ 65							3.07	0.128
> 65							(0.72 - 13.02)	
Lymphknotenmetastasen							(1.00 Referenz)	
Negativ			(1.00 Referenz)				11.97	0.001
Positiv			36 (3.33 - 391)	0,003			(2.70 – 53.12)	
T-Stadium								
pT1					(1.00 Referenz)			
pT2/pT3					0.318	0,0837		
					(0.09 - 1.16)			
Diabetes mellitus								
Negativ					(1.00 Referenz)			
Positiv					3.86	0,0384		
					(1.07 - 13.86)			
Hypertonie								
Negativ					(1.00 Referenz)			
Positiv					0.337	0,0987		
					(0.09 - 1.23)			
COPD								
Negativ					(1.00 Referenz)			
Positiv					2.86	0,133		
					(0.73 - 11.27)			
Phimose								
Negativ					(1.00 Referenz)			
Positiv					0.246	0,0333		
					(0.07 - 0.89)			
N Stadium								
Negativ					(1.00 Referenz)			
Positiv					0.287	0,164		
					(0.05 - 1.67)			
Grading								
G1/G2					0.43 (0.16 - 1.18)	0,102		
G3/G4					(1.00 Referenz)			
Akt								
Niedrige Expression	(1.00 Referenz)		(1.00 Referenz)					
Hohe Expression	3.43 (1.22 - 9.68)	0,0197	7.53 (1.12 - 50.5)	0,0377				
pmTOR								
Niedrige Expression			(1.00 Referenz)					
Hohe Expression			9.95 (1.25 - 79.3)	0,0301				
p4EBP1								
Niedrige Expression			(1.00 Referenz)					
Hohe Expression			5.99 (0.779 - 46.1)	0,0855				
pPRAS								
Niedrige Expression					(1.00 Referenz)			
Hohe Expression					0.132	0,113		
					(0.01 - 1.62)			

Die klinischen Parameter und die Expression der Biomarker wurden im Hinblick auf das Gesamt-, krankheitsspezifische, rezidivfreie und metastasenfreie Überleben (OS, DSS, RFS und MFS) analysiert. Eine erhöhte Expression von panAkt zeigte sich als unabhängiger Prädiktor für ein schlechteres Gesamtüberleben HR 3.43, 95% Konfidenzintervall (1.22-9.68), $p=0.0197$. Mit Blick auf das krankheitsspezifische Überleben war eine erhöhte Expression von panAkt ebenfalls unabhängig mit einem schlechteren Outcome assoziiert HR 7.53, 95% Konfidenzintervall (1.2-50.5), $p=0.0377$. Eine erhöhte pmTOR Expression war weiterhin unabhängig mit schlechterem krankheitsspezifischem Überleben verknüpft HR 9.95, 95% Konfidenzintervall (1.25-79.3), $p=0.0301$. In der multivariaten Cox-Regression der klinischen Parameter zeigte sich weiterhin, dass das Auftreten von Lymphknotenmetastasen mit schlechterem Outcome für das krankheitsspezifische Überleben HR 36, 95% Konfidenzintervall (3.33-391), $p=0.003$ und dem metastasenfrem Überleben HR 11.97, 95% Konfidenzintervall (2.70-53.5.12), $p=0.001$ assoziiert ist. Die Vorerkrankung Diabetes Mellitus war in Bezug auf das rezidivfreie Überleben unabhängig mit schlechterem Outcome verknüpft HR 3.86, 95% Konfidenzintervall (1.07-13.86), $p=0.0384$. Das Vorliegen einer Phimose stand mit einem günstigeren rezidivfreien Überleben im Zusammenhang HR 0.246, 95% Konfidenzintervall (0.07-0.89), $p=0.0333$. Für die erhöhte Expression von panAkt zeigte sich ein Trend für ein günstigeres rezidivfreies Überleben HR 0.132, 95% Konfidenzintervall (0.02-1,04), $p=0.0543$.

Diskussion

Personalisierte Behandlungsmethoden gewinnen in vielen Bereichen der Medizin an Bedeutung. Die molekulare Charakterisierung von malignen Tumorerkrankungen führt zu neuen umfassenden, zielgerichteten Therapiekonzepten und etabliert so zunehmend die Präzisionsmedizin. Bei der Erforschung und Entwicklung neuerer Therapieansätze werden seltene Krankheiten häufig vernachlässigt. Weil die präklinische Forschung nicht im Mittelpunkt des Forschungsinteresses der Pharmaindustrie steht und das Peniskarzinom eine seltene Erkrankung ist, wird die Erforschung dieser Tumorentität nicht ausreichend gefördert. Tumormodelle die sich auf molekulare evidenzbasierte Studien stützen sind rar (49). Folglich ist die Entstehung des Peniskarzinoms auf molekularer Ebene bis heute noch nicht hinreichend verstanden. Eine Studie von Ferrándiz-Pulido et al (50). zeigte, dass bei Peniskarzinomen in 9% somatische Nonsense-Mutationen im PI3K Gen vorhanden sind. Dennoch wird das Protein vermehrt produziert und so der PI3K-mTOR-Akt Signalweg stimuliert (50). Daneben stellen Alzahrani et al. in einer Arbeit die verschiedenen Ansätze der medikamentösen Beeinflussung dieses Signalweges bei verschiedenen Tumorentitäten dar. Mittlerweile sind Medikamente auf dem Markt verfügbar, welche PI3K blockieren. So hat Copanlisib eine Zulassung für die Behandlung des folliculären Lymphoms. Duvelisib wird bei chronisch lymphatischer Leukämie eingesetzt (51). Alpelisib kommt bei HR-positivem, HER2-negativem, PI3K-mutiertem, fortgeschrittenem oder metastasiertem Brustkrebs zum Einsatz (52). Medikamente, welche gezielt das Protein Akt in Tumorzellen blockieren, befinden sich gerade in der Entwicklungsphase. Zugelassen ist momentan der Akt Inhibitor Miltefosin. Dieses Medikament wird bei der Therapie von viszeraler und kutaner Leishmaniose eingesetzt (51). Hingegen sind Medikamente, die mTOR blockieren, bereits zugelassen. So wird Rapamycin unter anderem als Immunsuppressivum verwendet. Everolimus, Sirolimus und Temsirolimus sind für die Behandlung von verschiedenen Tumorentitäten zugelassen. Everolimus wird bei fortgeschrittenen neuroendokrinen Tumoren, sowie Brustkrebs und fortgeschrittenen Nierenzellkarzinomen eingesetzt. Ebenfalls wird Temsirolimus bei der Therapie von fortgeschrittenen Nierenzellkarzinomen eingesetzt (51). Ein Einsatz dieser Medikamentengruppe bei Peniskarzinom ist denkbar, jedoch ist die Rolle des PI3K/ mTOR/ AKT Signalweges bei Peniskarzinom noch nicht abschließend erforscht. Zunächst müssen präklinische Daten gesammelt werden, um

einen möglichen therapeutischen Ansatz in der Behandlung dieser Malignität zu ermöglichen.

Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit reihen sich mit Erkenntnissen anderer Autoren ein. Die TMA-basierte Studie mit insgesamt 57 Patienten von Azizi et al. (44) zeigte, dass bei einer geringen Expression des Biomarkers pAkt ein erhöhtes Risiko für Rezidive bestand. Ebenfalls zeigte sich in der Studie ein Zusammenhang zwischen einer niedrigen Expression des Proteins pS6 und schlechterem Gesamtüberleben. Die Autoren konnten ebenfalls einen Zusammenhang von einer erhöhten pAkt Expression in Low-Grade Tumoren (G1/G2) feststellen. Die pAkt Expression war im Hinblick auf die T-Stadien nicht signifikant. Dagegen fanden Stankiewicz et al. (43) in ihrer Arbeit mit 148 TMAs eine signifikante negative Korrelation von pAkt mit dem T-Stadium bei Peniskarzinom. Chaux et al. (42) berichteten allerdings bei der Auswertung von 112 TMAs von Peniskarzinompatienten von einer höheren pAkt Konzentration bei High-Grade Tumoren. Interessanterweise war das Protein pS6 in ihrer Publikation in niedrig-gradigen Tumoren signifikant höher als in High-Grade Tumoren. In unserer Analyse war weder pAkt noch pS6 mit den klinisch-pathologischen Parametern oder dem Überleben assoziiert. Die Diskrepanz der Ergebnisse lässt sich möglicherweise auch mit den unterschiedlichen immunhistochemischen Bewertungsmethoden (H-Score versus IRS) erklären. In der Klassifizierung des Expressionsniveaus zwischen hoher und niedriger Expression gibt es methodische Unterschiede (Quartilmethode versus Youden-Index). In unserer Studie wurden bei High-Grade Tumoren häufiger erhöhte Werte von panAkt beobachtet. Eine erhöhte Expression von panAkt war unabhängig mit einem schlechterem Gesamtüberleben und krankheitsspezifischen Überleben assoziiert. Matsuo et al. (53) zeigten, dass bei Patienten mit metastasiertem Verlauf eines oralen Plattenepithelkarzinoms eine erhöhte Expression von panAkt, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Metastasen, vorlag. Es zeigte sich jedoch keine Erhöhung von pAkt. Für eine weitere Tumorentität, dem Cholangiokarzinom, zeigten Javle et al. einen Zusammenhang von panAkt und dem Gesamtüberleben. Eine erhöhte Expression von panAkt war hier mit einem verbesserten Gesamtüberleben assoziiert. Für pAkt konnte jedoch keine prognostischen Eigenschaften für das Gesamtüberleben gezeigt werden (54). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu unseren Erkenntnissen. Ebenfalls zeigten die Forscher eine Korrelation zwischen der Expression von panAkt und pAkt (54). Dagegen zeigte sich

in unserer Untersuchung keine Korrelation zwischen den Markern pAkt und panAkt. Damit bleibt das Testpotenzial als Tumormarker, über die statistischen Fragestellungen hinaus, fraglich. In dieser Studie war panAkt mit dem Gesamtüberleben und krankheitsspezifischen Überleben assoziiert. Keine Korrelation zeigte sich dagegen bei metastasenfremem und rezidivfreiem Überleben. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Zeit-bis-Ereignis Variable RFS lokale, regionale und Fernmetastasen umfasst. Lokalrezidive haben aber beim Peniskarzinom bekanntlich keinen Einfluss auf das Gesamt- und Metastasen-freie Überleben (55). Die Korrelation der Expression von panAkt und pAkt bei der Prognose scheint je nach Malignitätsgrad zu variieren. Kreisberg et al. (56) zeigten, dass eine erhöhte pAkt Expression ein Prädiktor für eine schlechtere Prognose bei Prostatakarzinomen darstellt. Das PSA-Versagen wurde hierbei als Surrogatmarker für ein schlechteres klinisches Outcome gewertet. Weiterhin zeigten Dai et al. (57) in ihrer Untersuchung dass die Expression von pAkt bei Melanomen im Zusammenhang mit Tumorprogress und Tumordinvasion steht und mit einem schlechteren Gesamtüberleben einhergeht. Darüber hinaus zeigten Lu et al.(58) bei 341 Patientenproben mit kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC), dass eine erhöhte Expression von pAkt signifikant mit Auftreten von Metastasen und verkürztem Gesamtüberleben im Zusammenhang stand. Dagegen zeigten Shah et al. (59) mit einer Studienkohorte von 82 Patienten, dass eine hohe Expression von pAkt einen begünstigenden Prognosefaktor bei NSCLC darstellt. Eine hohe pAkt Expression korrelierte auch mit High-Grade Tumoren. Die Konzentration von pAkt scheint keine sichere Korrelation mit dem Grading und dem Gesamt-, krankheitsspezifischen, rezidivfreien und metastasenfremem Überleben zu besitzen. Jedoch sind die Patientenkohorten zu klein, um daraus robuste Erkenntnisse zu erzielen. Weiterhin zeigten Ferrandiz-Pulido et al. (45) mit einer Studienkohorte von 67 Peniskarzinompatienten, dass im Stadium pT1 eine niedrigere pmTOR Konzentration gemessen wurde, als bei Tumoren in höheren pT-Stadien. Ebenfalls konnte ein signifikanter Zusammenhang von Lymphknotenmetastasen und der pmTOR Expression gezeigt werden. Der Anteil an Patienten mit höheren T-Stadien (pT2 und pT3) beträgt hier 51,6% (45). Andererseits zeigte unsere Arbeit keinen signifikanten Zusammenhang von pmTOR mit den pT-Stadien. Allerdings zeigte sich in unserer Untersuchung ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer erhöhten pmTOR Konzentration und Low-Grade Tumoren (G1/G2), was zunächst überraschend erscheint. Weiterhin zeigte pmTOR bei hoher Expression eine Korrelation mit dem

ungünstigen krankheitsspezifischen Überleben. Andere Forschungsgruppen haben interessanterweise keinen Zusammenhang zwischen dem Grading und der Prognose bei Peniskarzinom gefunden. Wen et al. (60) untersuchten prognostische Faktoren bei insgesamt 135 Patienten mit Peniskarzinom und stellten dabei keinen signifikanten Einfluss des Gradings auf die Prognose fest. Weiterhin zeigten Li et al. (61) in ihrer Untersuchung ebenfalls, dass das Grading keinen Einfluss auf das DSS hatte. Eine Gruppe um Emerson et al. (62) demonstrierte ebenso in einer kleinen Kohorte von 22 Patienten, dass das Grading keinen Einfluss auf die Tumorprogression hatte. Daneben präsentierten Soria et al. (63) in einer Arbeit mit 102 Patienten in der univariaten Analyse keinen Zusammenhang zwischen Grading und dem DSS, OS, RFS. Die Häufigkeitsverteilung des jeweiligen Gradings in den Kohorten könnte hier eine Rolle bei den unterschiedlichen Ergebnissen spielen. Ebenfalls könnten statistische Verzerrungen aufgrund der kleinen Patientenkohorte eine mögliche Erklärung darstellen. Weiterhin wäre das Ergebnis dadurch erklärbar, dass die Aktivierung von mTOR bei Low-Grade Tumoren zu einer Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs und Steigerung der Proteinsynthese in den Tumorzellen führt. Diese zeigte sich jüngst bei der Tumorentität des Prostatakarzinom (64). Bei Fortschreiten der Tumorerkrankung, hin zu einem High-Grade Tumor, könnte eine sich möglicherweise entwickelnde Hypoxie, den mTOR Signalweg in den Tumorzellen herunterregulieren. Das würde zu einer niedrigeren pmTOR Konzentration in High-Grade Tumoren führen. (65) Für den Ansatz der Hypoxie-assoziierten Aspekte liegt bei der Erforschung des Peniskarzinoms noch keine ausreichende Evidenz vor. Weitere Untersuchungen hierzu wären wünschenswert. Des Weiteren wäre eine Untersuchung der Rolle der Komplexe mTOR1 und mTORC2 anzustreben, um hier genauere Informationen zu erlangen. In diesem Projekt lag der Fokus vor allem auf dem gesamten mTOR. Aus der mTOR Signalkaskade steht auch p4EBP1 im Fokus der klinischen Forschung. Bei Castellvi et al. (66) wurde in einer TMA basierten Studie mit 120 Patienten den Stellenwert von Expression von p4EBP1 bei Endometriumkarzinom untersucht. Hier zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer erhöhten p4EBP1 Expression und einem verkürzten Gesamtüberleben. Dieser Ansatz wurde auch von Ferrandiz-Pulido et al. (45) untersucht. In ihrer Arbeit konnte keine Überexpression von p4EBP1 in Peniskarzinom-Geweben festgestellt werden. In unserer Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von p4EBP1 mit einem kürzeren krankheitsspezifischen Überleben einher ging. Weitere Untersuchungen sind

erforderlich, um das therapeutische Potenzial der Blockade von p4EBP1 zu erkunden. Bei anderen Tumorentitäten scheint pS6 eine wichtige Rolle zu spielen. García-Carracedo et al. (67) fanden in ihrer TMA Studie mit 432 Patienten heraus, dass erhöhte Expression von pS6 bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich mit einer günstigeren Prognose einhergehen. Somit könnte die Expression von pS6 im Rahmen des PI3K/ mTOR/ AKT Signalweges Potenzial für einen prognostischen Marker haben. Einen Zusammenhang von pS6 Erhöhung und High-Grade Tumoren konnte aber bei unseren Patienten nicht detektiert werden. Darüber hinaus bietet das Signalmolekül PTEN einen Ansatz für weitere Untersuchungen. Auf der einen Seite zeigten Stankiewicz et al. (43) bei 148 Patientenproben, dass PTEN signifikant mit dem Grading bei Peniskarzinom korrelierte. Dagegen waren bei der Untersuchung von Azizi et al. (44) bei 57 Patienten kein Zusammenhang zwischen der Expression von PTEN und dem Tumorgrading festgestellt worden. Ebenso untersuchten Chaux et al. (42) ihren TMA mit 112 Patienten auf die PTEN Expression und fanden keine Korrelation zwischen der PTEN-Expression und dem Tumorgrading (High oder Low).

Darüber hinaus ist der Zusammenhang von HPV Infektion und Entstehung eines Peniskarzinoms aktuell im Fokus zahlreicher Untersuchungen. Ein besonderer Blick richtet sich auf die mögliche Aktivierung des mTOR-Signalweges bei einer HPV Infektion. Ferrandiz-Pulido et al. (45) zeigten in einer Arbeit mit 67 Patienten eine erhöhte Expression von pmTOR in HPV negativen Tumoren. In dieser Arbeit zeigte sich jedoch keine Assoziation eines der untersuchten Biomarker panAkt, pAkt, pmTOR, pS6, p4EBP1, pPRAS, pp70S6K, mTOR und s6K1 mit dem Vorliegen einer HPV Infektion. Auch bei Chaux et al. (42) zeigte die jeweilige Expression von PTEN, pAkt, pmTOR und pS6 keine Assoziation mit einer HPV Infektion. Ebenso fanden auch Stankiewicz et al. (43) bei ihrer Studie mit 148 Patienten keinen Zusammenhang zwischen einer HPV Infektion und den Biomarker HER4, pAkt, Akt und PTEN beim Peniskarzinom. Dagegen zeigte eine Arbeit von Molinolo et al. (68), dass bei oralen und zervikalen Plattenepithelkarzinomen der mTOR Signalweg bei HPV positiven, aber auch bei HPV negativen Tumoren aktiviert ist. Vor allem die Biomarker pS6 und pAkt zeigten sich erhöht. Der mögliche Zusammenhang einer HPV-Infektion und einer einhergehenden Dysregulation im PI3K/ mTOR/ AKT Signalweg bedarf weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassung

Es wurden neun Biomarker des PI3K/ mTOR/ AKT Signalwegs in dieser Arbeit untersucht. Es zeigte sich eine Assoziation von ausgewählten Proteinen des PI3K/ mTOR/ AKT Signalwegs mit histologischen Merkmalen und Überlebenseigenschaften der Patienten mit Peniskarzinom, wobei Akt am vielversprechendsten war. Die Aktivierung des mTOR Signalweges und der nachgeschalteten Zellsignalmoleküle scheint eine bedeutende Rolle für die Progression des Peniskarzinoms zu spielen. Die genauen molekularen Mechanismen, die eine Tumorentstehung begünstigen, sind noch nicht abschließend aufgeklärt. Der Zusammenhang zwischen einer HPV Infektion und der Tumorentstehung muss ebenfalls genauer untersucht werden. Weitere translationale Forschung wird hier Aufschluss geben.

Limitationen

Um eine wissenschaftliche Vergleichbarkeit der Daten zu erhalten, wurde sich bei der Auswertung und bei den Korrelationsparametern an aktuellen Forschungsergebnissen orientiert. Durch das retrospektive Studiendesign sind jedoch diverse Bias möglich. In unserer Untersuchung war die genaue Klassifizierung der Proben im pT1 Stadium in pT1a und pT1b erst nach dem Jahr 2010 verfügbar. Somit waren die Auswertung und Vergleichbarkeit dieser Kategorien mit anderen Studien und die Aufnahme in unser statistisches Modell nicht möglich. Die limitierte Patientenzahl in der Studie schränkt die Stabilität des statistischen Modells ein und erschwert die Verallgemeinerung der Ergebnisse.

Bemerkung

Ergebnisse dieser Arbeit wurden gemäß § 9, Abs. 4 der Promotionsordnung vom 23. Oktober 2017 nach Anzeige vom 13.06.2019 in Cancers 2021, 13, 2323 (<https://doi.org/10.3390/cancers13102323>) (69) vorveröffentlicht.

Die statistische Auswertung wurde durch Mitarbeiter des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz betreut.

Zur besseren Lesbarkeit wurde in dieser Arbeit auf die zeitgleiche Verwendung der verschiedenen Sprachformen von männlich, weiblich und divers weitestgehend verzichtet. Es besteht keine Wertung der einzelnen Geschlechter.

Literaturverzeichnis

1. Parkin DM WS, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. Cancer Incidence in Five Continents Volume VIII. IARC Scientific Publication [Internet]. 2002; VIII
2. Hakenberg OW, Comperat EM, Minhas S, Necchi A, Protzel C, Watkin N. EAU guidelines on penile cancer: 2014 update. *Eur Urol.* 2015;67(1):142-50.
3. Thomas A, Necchi A, Muneer A, Tobias-Machado M, Tran ATH, Van Rompuy A-S, et al. Penile cancer. *Nature Reviews Disease Primers.* 2021;7(1):11.
4. Wang J, Pettaway CA, Pagliaro LC. Treatment for Metastatic Penile Cancer After First-line Chemotherapy Failure: Analysis of Response and Survival Outcomes. *Urology.* 2015;85(5):1104-10.
5. Sun H, Lesche R, Li D-M, Liliental J, Zhang H, Gao J, et al. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1999;96(11):6199-204.
6. Laplante M, Sabatini David M. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell.* 2012;149(2):274-93.
7. Backes DM, Kurman RJ, Pimenta JM, Smith JS. Systematic review of human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer. *Cancer Causes Control.* 2009;20(4):449-57.
8. Chaux A, Netto GJ, Rodriguez IM, Barreto JE, Oertell J, Ocampos S, et al. Epidemiologic profile, sexual history, pathologic features, and human papillomavirus status of 103 patients with penile carcinoma. *World J Urol.* 2013;31(4):861-7.
9. Bleeker MC, Heideman DA, Snijders PJ, Horenblas S, Dillner J, Meijer CJ. Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. *World J Urol.* 2009;27(2):141-50.
10. Archier E, Devaux S, Castela E, Gallini A, Aubin F, Le Maitre M, et al. Carcinogenic risks of psoralen UV-A therapy and narrowband UV-B therapy in chronic plaque psoriasis: a systematic literature review. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2012;26 Suppl 3:22-31.
11. Ulf-Moller CJ, Simonsen J, Frisch M. Marriage, cohabitation and incidence trends of invasive penile squamous cell carcinoma in Denmark 1978-2010. *Int J Cancer.* 2013;133(5):1173-9.
12. Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, Schwartz SM, Shera KA, Wurscher MA, et al. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease. *Int J Cancer.* 2005;116(4):606-16.
13. Koifman L, Vides AJ, Koifman N, Carvalho JP, Ornellas AA. Epidemiological aspects of penile cancer in Rio de Janeiro: evaluation of 230 cases. *Int Braz J Urol.* 2011;37(2):231-40; discussion 40-3.
14. Stankiewicz E, Kudahetti SC, Prowse DM, Ktori E, Cuzick J, Ambrosine L, et al. HPV infection and immunochemical detection of cell-cycle markers in verrucous carcinoma of the penis. *Mod Pathol.* 2009;22(9):1160-8.
15. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine.* 2006;24 Suppl 3:S3/1-10.
16. Maden C, Sherman KJ, Beckmann AM, Hislop TG, Teh CZ, Ashley RL, et al. History of circumcision, medical conditions, and sexual activity and risk of penile cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85(1):19-24.
17. Tsen HF, Morgenstern H, Mack T, Peters RK. Risk factors for penile cancer: results of a population-based case-control study in Los Angeles County (United States). *Cancer Causes Control.* 2001;12(3):267-77.

18. Christakis DA, Harvey E, Zerr DM, Feudtner C, Wright JA, Connell FA. A trade-off analysis of routine newborn circumcision. *Pediatrics*. 2000;105(1 Pt 3):246-9.
19. Chaux A, Cubilla AL. Advances in the pathology of penile carcinomas. *Hum Pathol*. 2012;43(6):771-89.
20. Hübner J, Albert J. *Onkologie interdisziplinär: evidenzbasiert - integrativ - patientenzentriert ; mit 87 Tabellen*. Stuttgart: Schattauer; 2014. XXVI, 517 S. p.
21. Cubilla AL, Barreto J, Caballero C, Ayala G, Riveros M. Pathologic features of epidermoid carcinoma of the penis. A prospective study of 66 cases. *Am J Surg Pathol*. 1993;17(8):753-63.
22. Cubilla AL, Lloveras B, Alemany L, Alejo M, Vidal A, Kasamatsu E, et al. Basaloid Squamous Cell Carcinoma of the Penis With Papillary Features: A Clinicopathologic Study of 12 Cases. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2012;36(6):869-75.
23. Protzel C. HO. Peniskarzinom. In: Michel M. TJ, Janetschek G., Wirth M. (eds), editor. *Die Urologie*. Springer, Berlin, Heidelberg: Springer Reference Medizin; 2016.
24. Tsaour IH, Axel. Peniskarzinom. In: Hübner J, Albert JG, editors. *Onkologie interdisziplinär : evidenzbasiert - integrativ - patientenzentriert*

Stuttgart2014.

25. Kayes O, Minhas S, Allen C, Hare C, Freeman A, Ralph D. The role of magnetic resonance imaging in the local staging of penile cancer. *Eur Urol*. 2007;51(5):1313-8; discussion 8-9.
26. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Peniskarzinoms, Langversion 1.0. AWMF Registernummer: 043-042OL.; <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/peniskarzinom/> , (abgerufen am 27.05.2021); 2020.
27. Miller K, Hinz S. TNM und andere Prognosesysteme. In: Hautmann R, Gschwend JE, editors. *Urologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 505-15.
28. Wittekind C. *TNM Klassifikation Maligner Tumoren : Korrigierter Nachdruck 2020 Mit Allen Ergänzungen der UICC Aus Den Jahren 2017 Bis 2019*. Newark, GERMANY: John Wiley & Sons, Incorporated; 2020.
29. *Urologie*. In: Hautmann R, editor. *Springer-Lehrbuch*. 4th ed. 2010 ed. Berlin, Heidelberg2010.
30. Crook J, Pagliaro L, Pettaway C. Penis. *UICC Manual of Clinical Oncology2015*. p. 384-91.
31. Hertle L, Bierer S, Gschwend JE, Tschirdewahn S, Dorp Fv, Rübber H, et al. Tumoren. In: Hautmann R, Gschwend JE, editors. *Urologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 169-247.
32. Shabbir M, Muneer A, Kalsi J, Shukla CJ, Zacharakis E, Garaffa G, et al. Glans resurfacing for the treatment of carcinoma in situ of the penis: surgical technique and outcomes. *Eur Urol*. 2011;59(1):142-7.
33. Alnajjar HM, Lam W, Bolgeri M, Rees RW, Perry MJ, Watkin NA. Treatment of carcinoma in situ of the glans penis with topical chemotherapy agents. *Eur Urol*. 2012;62(5):923-8.
34. Tsaour I, Haferkamp A. Peniskarzinom. In: Hübner J, Albert JG, editors. *Onkologie interdisziplinär : evidenzbasiert - integrativ - patientenzentriert*

Stuttgart2014.

35. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol*. 2014;4:64.

36. Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature*. 2006;441(7092):424-30.
37. Memmott RM, Dennis PA. Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cellular Signalling*. 2009;21(5):656-64.
38. Garcia JA, Danielpour D. Mammalian target of rapamycin inhibition as a therapeutic strategy in the management of urologic malignancies. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(6):1347-54.
39. A. Heidenreich CD, M.Schnek, G. Jakse. Uroonkologie. In: Rübben H, editor. 6., vollst. überarb. Aufl. ed. Berlin u.a.2014. p. 374-5.
40. Kim LC, Cook RS, Chen J. mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment. *Oncogene*. 2017;36(16):2191-201.
41. Majumder PK, Febbo PG, Bikoff R, Berger R, Xue Q, McMahon LM, et al. mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. *Nat Med*. 2004;10(6):594-601.
42. Chaux A, Munari E, Cubilla AL, Hicks J, Lecksell K, Burnett AL, et al. Immunohistochemical expression of the mammalian target of rapamycin pathway in penile squamous cell carcinomas: a tissue microarray study of 112 cases. *Histopathology*. 2014;64(6):863-71.
43. Stankiewicz E, Prowse DM, Ng M, Cuzick J, Mesher D, Hiscock F, et al. Alternative HER/PTEN/Akt pathway activation in HPV positive and negative penile carcinomas. *PLoS One*. 2011;6(3):e17517.
44. Azizi M, Tang DH, Verduzco D, Peyton CC, Chipollini J, Yuan Z, et al. Impact of PI3K-AKT-mTOR Signaling Pathway Up-regulation on Prognosis of Penile Squamous-Cell Carcinoma: Results From a Tissue Microarray Study and Review of the Literature. *Clin Genitourin Cancer*. 2019;17(1):e80-e91.
45. Ferrandiz-Pulido C, Masferrer E, Toll A, Hernandez-Losa J, Mojal S, Pujol RM, et al. mTOR signaling pathway in penile squamous cell carcinoma: pmTOR and pelf4E over expression correlate with aggressive tumor behavior. *J Urol*. 2013;190(6):2288-95.
46. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*. 1987;8(3):138-40.
47. Hoo ZH, Candlish J, Teare D. What is an ROC curve? *Emerg Med J*. 2017;34(6):357-9.
48. Dr. rer. nat. Mario Schindeldecker P. Biomarkerauswertung [html]. 2018 [
49. Thomas A, Alvim LMdC, Rainho CA, Juengel E, Alexander R, Blaheta4, et al. Systemic treatment of penile squamous cell carcinoma—hurdles

and hopes of preclinical models and clinical regimens: a narrative

review. *Translational Andrology and Urology*. 2020:14.

50. Ferrándiz-Pulido C, Hernández-Losa J, Masferrer E, Vivancos A, Somoza R, Marés R, et al. Identification of somatic gene mutations in penile squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2015;54(10):629-37.
51. Alzahrani AS. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: At the bench and bedside. *Semin Cancer Biol*. 2019;59:125-32.
52. Popova NV, Jücker M. The Role of mTOR Signaling as a Therapeutic Target in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(4):1743.
53. Matsuo FS, Andrade MF, Loyola AM, da Silva SJ, Silva MJB, Cardoso SV, et al. Pathologic significance of AKT, mTOR, and GSK3 β proteins in oral squamous cell carcinoma-affected patients. *Virchows Arch*. 2018;472(6):983-97.

54. Javle MM, Yu J, Khoury T, Chadha KS, Chadha KC, Iyer RV, et al. Akt expression may predict favorable prognosis in cholangiocarcinoma. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2006;21(11):1744-51.
55. Lindner AK, Schachtner G, Steiner E, Kroiss A, Uprimny C, Steinkohl F, et al. Organ-sparing surgery of penile cancer: higher rate of local recurrence yet no impact on overall survival. *World J Urol*. 2020;38(2):417-24.
56. Kreisberg JI, Malik SN, Prihoda TJ, Bedolla RG, Troyer DA, Kreisberg S, et al. Phosphorylation of Akt (Ser473) is an excellent predictor of poor clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res*. 2004;64(15):5232-6.
57. Dai DL, Martinka M, Li G. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. *J Clin Oncol*. 2005;23(7):1473-82.
58. Lu J, Zang H, Zheng H, Zhan Y, Yang Y, Zhang Y, et al. Overexpression of p-Akt, p-mTOR and p-eIF4E proteins associates with metastasis and unfavorable prognosis in non-small cell lung cancer. *PLOS ONE*. 2020;15(2):e0227768.
59. Shah A, Swain WA, Richardson D, Edwards J, Stewart DJ, Richardson CM, et al. Phospho-akt expression is associated with a favorable outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(8):2930-6.
60. Wen S, Ren W, Xue B, Fan Y, Jiang Y, Zeng C, et al. Prognostic factors in patients with penile cancer after surgical management. *World J Urol*. 2018;36(3):435-40.
61. Li ZS, Yao K, Chen P, Zou ZJ, Qin ZK, Liu ZW, et al. Disease-specific survival after radical lymphadenectomy for penile cancer: prediction by lymph node count and density. *Urol Oncol*. 2014;32(6):893-900.
62. Emerson RE, Ulbright TM, Eble JN, Geary WA, Eckert GJ, Cheng L. Predicting cancer progression in patients with penile squamous cell carcinoma: the importance of depth of invasion and vascular invasion. *Mod Pathol*. 2001;14(10):963-8.
63. Soria JC, Fizazi K, Piron D, Kramar A, Gerbaulet A, Haie-Meder C, et al. Squamous cell carcinoma of the penis: multivariate analysis of prognostic factors and natural history in monocentric study with a conservative policy. *Ann Oncol*. 1997;8(11):1089-98.
64. Evren S, Dermen A, Lockwood G, Fleshner N, Sweet J. Immunohistochemical examination of the mTORC1 pathway in high grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinomas (PCa): a tissue microarray study (TMA). *Prostate*. 2010;70(13):1429-36.
65. Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, et al. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev*. 2004;18(23):2893-904.
66. Castellvi J, Garcia A, Ruiz-Marcellan C, Hernández-Losa J, Peg V, Salcedo M, et al. Cell signaling in endometrial carcinoma: phosphorylated 4E-binding protein-1 expression in endometrial cancer correlates with aggressive tumors and prognosis. *Hum Pathol*. 2009;40(10):1418-26.
67. García-Carracedo D, Villaronga M, Álvarez-Teijeiro S, Hermida-Prado F, Santamaría I, Allonca E, et al. Impact of PI3K/AKT/mTOR pathway activation on the prognosis of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Oncotarget*. 2016;7(20):29780-93.
68. Molinolo AA, Marsh C, El Dinali M, Gangane N, Jennison K, Hewitt S, et al. mTOR as a molecular target in HPV-associated oral and cervical squamous carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2012;18(9):2558-68.
69. Thomas A, Reetz S, Stenzel P, Tagscherer K, Roth W, Schindeldecker M, et al. Assessment of PI3K/mTOR/AKT Pathway Elements to Serve as Biomarkers and Therapeutic Targets in Penile Cancer. *Cancers*. 2021;13(10):2323.

Danksagung

Lebenslauf