

Aus dem Bereich
Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

Die Rolle von Exosomen in der Resistenzentwicklung gegen Tyrosinkinaseinhibitoren (Sunitinib) im Nierenzellkarzinom

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2023

vorgelegt von: Martin Wallisch
geboren am: 17.07.1997 in Wiesbaden

Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Stöckle

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	7
1. ABSTRACT	8
2. EINLEITUNG	9
2.1 Das Nierenzellkarzinom	9
2.1.1 Epidemiologie	9
2.1.2 Ätiologie	9
2.1.3 Genetische Syndrome	9
2.1.4 Klassifikation	10
2.1.5 Symptomatik und Diagnosen	13
2.1.6 Therapie	14
2.1.7 Resistenzentwicklung gegen Tyrosinkinaseinhibitoren	23
2.2 Extrazelluläre Vesikel	23
2.2.1 Definition und Klassifikation	23
2.2.2 Exosomen	24
2.2.3 Rolle in der Resistenzentwicklung	26
3. ZIEL DER ARBEIT	27
4. MATERIAL UND METHODEN	28
4.1 Material	28
4.2 Methoden	30
4.2.1 Zellkultur	30
4.2.2 WST-1 Cell Viability Assay	33
4.2.3 Isolation von Exosomen mittels Ultrazentrifugation	34
4.2.4 Stimulation von Caki-2 Zellen mit Exosomen	35
4.2.5 Exosomencharakterisierung	37
5. ERGEBNISSE	44
5.1 Ermittlung des Effektes von Sunitinib auf die Zellviabilität	44
5.2 Isolation von Exosomen mittels Ultrazentrifugation	46
5.3 Exosomencharakterisierung	47
5.3.1 Nanotracking Analyse	47
5.3.2 Nachweis von Exosomenmarker	48
5.3.3 Inokulationsnachweis mittels Fluoreszenzmarkierung	49

5.4 Effekt von Exosomen von Sunitinib-resistenten Caki-2 Zellen	51
6. DISKUSSION	55
6.1 Ermittlung des Effektes von Sunitinib auf die Zellviabilität	56
6.1.1 Etablierung der Sunitinib-resistenten Zelllinie	56
6.2 Isolation und Qualitative Analyse von Exosomen	57
6.2.1 Isolation von Exosomen	57
6.2.2 Charakterisierung von Exosomen	58
6.3 Ermittlung des Effektes von Exosomen	59
6.3.1 Stimulation von Caki-2 Wildtyp-Zellen mit Exosomen	59
6.4 Resistenz gegen Sunitinib im NZK	61
6.5 Fazit und Ausblick	63
7. QUELLENVERZEICHNIS	64
8. DANKSAGUNG	82
9. ANHANG	83
9.1 Lebenslauf	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation maligner Nierentumoren, 8. Auflage (2017)	12
Tabelle 2: UICC-Stadien maligner Nierentumoren, 8. Auflage (2017).....	13
Tabelle 3: ISUP-Graduierung des klarzelligen und papillären NZK (Delahunt et al., 2013)...	13
Tabelle 4: Funktions- und Regulationsgene von HIF, adaptiert nach Maxwell et al. (2001) ..	17
Tabelle 5: Prognosekriterien des IMDC zur Bestimmung der Risikogruppe (Heng et al. (2013))	21
Tabelle 6: Prognose nach Risikogruppe bei Erstlinientherapie (Heng et al. (2013))	22
Tabelle 7: Systemtherapieoptionen gemäß Risikoprofil in der Erstlinientherapie nach den S3-Leitlinien der DGU (2023).....	22
Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellernamen.....	28
Tabelle 9: Verwendete Geräte mit Herstellernamen	29
Tabelle 10: Verwendete Chemikalien mit Herstellernamen	29
Tabelle 11: Verwendete Kits mit Herstellernamen	30
Tabelle 12: Verwendete Puffer und Lösungen.....	39
Tabelle 13: Primärantikörper mit Zielantigenen, Verdünnung, Größe und Herkunft.....	41
Tabelle 14: Protokoll der Zytoskelettfärbung mit Phalloidin-iFluor 488 Konjugat	43
Tabelle 15: Ultrazentrifugationen unter Angabe der Zellart, Passage, verwendete Zellkulturflaschen und Exosomenkonzentration.....	46

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Signalwege und Medikamente des metastasierten Nierenzellkarzinoms, adaptiert von Choueiri, 2017.....	16
Abbildung 2: Entstehung und Charakteristika von EV, adaptiert von Linxweiler & Junker, 2020	25
Abbildung 3: 12 Well Plattenschema mit Versuchsaufbau und Exosomenkonzentrationen.	36
Abbildung 4: Ausschnitt eines 96 Well Plattenschemas mit Versuchsaufbau und Exosomenkonzentrationen	37
Abbildung 5: Zellviabilitäten von Caki-2 Wildtyp-Zellen der Passage 54 und Sunitinib-behandelte Zellen der Passage 52 unter Behandlung mit 5 µM Sunitinib.	44
Abbildung 6: Zellviabilitäten von Caki-2 Wildtyp-Zellen der Passage 60 und Sunitinib-behandelte Zellen der Passage 54 unter Behandlung mit 5 µM Sunitinib.	45
Abbildung 7: Zellviabilitäten von Caki-2 Wildtyp-Zellen der Passage 65 und Sunitinib-behandelten Zellen der Passage 65 unter Behandlung mit 3 bzw. 5 µM Sunitinib	46
Abbildung 8: Nanotrackinganalyse von Exosomen von Caki-2 Wildtyp-Zellen p.68	47
Abbildung 9: Nanotracking Analyse von Exosomen von Sunitinib-resistenten Caki-2 Zellen p.68/37	48
Abbildung 10: Western Blot Analyse von CD63, Syntenin, CD9 und GM130 in Exosomen von Caki-2 Wildtyp-Zellen.....	48
Abbildung 11: Darstellung der Aufnahme von Exosomen in Caki-2 Wildtyp-Zellen	49
Abbildung 12: Darstellung der Aufnahme von Exosomen in Caki-2 Wildtyp-Zellen	50
Abbildung 13: Ergebnisse der Exosomenstimulation Nr. 1.....	51
Abbildung 14: Relative Zellviabilitäten der Exosomenstimulation Nr. 1	52
Abbildung 15: Ergebnisse der Exosomenstimulation Nr. 2.....	53
Abbildung 16: Relative Zellviabilitäten der Exosomenstimulation Nr. 2	53
Abbildung 17: Durchschnittliche Zellviabilitäten der Exosomenstimulationen Nr. 1 und 2 ...	54
Abbildung 18: Relative Zellviabilitäten der Exosomenstimulationen Nr. 1 und 2.....	55

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Adenosin Triphosphat Bindende Kasette
AJCC	American Joint Commission of Cancer
AK	Antikörper
BCA	Bicinchoninsäure
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovines Serum Albumin
CPI	Checkpointinhibitor
CTLA-4	Cytotoxisches T-Lymphozyten-Assoziiertes Protein 4
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Peroxidase-Substrat für verbesserte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPO	Erythropoetin
EV	Extrazelluläre Vesikel
EZR	Extrazellulärraum
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
HIF	Hypoxie induzierter Faktor
IL	Interleukin
IMDC	International Metastatic RCC Database Consortium
INF	Interferon
ISEV	Internationale Gemeinschaft für Extrazelluläre Vesikel
ISUP	Internationale Gemeinschaft der urologischen Pathologie
lncRNA	long non coding Ribonukleinsäure
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
miRNA	Micro Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MV	Mikrovesikel
MVB	Multivesicular Bodies
NTA	Nanotracking Analyse
NZK	Nierenzellkarzinom
PAGE	Poly Acrylamid Gel Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGF	Wachstumsfaktor aus Thrombozyten
PD-1	Programmierter Zelltod Protein 1
PD-L1	Programmierter Zelltod Protein Ligand 1
PFA	Paraformaldehyd
pGp	P-Glykoprotein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Res	Resistent
RPMI	Zellkulturmedium, Roswell Park Memorial Institute
SDS	Natriumdodecylsulfat
Suni	Sunitinib
TBsT	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween20
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TNM	Tumor Nodes Metastasis
UICC	Union for International Cancer Control
VHL	Von-Hippel-Lindau
VEGF	Vaskulär-Endothelialer Wachstumsfaktor
WHO	World Health Organisation
WST	Wasserlösliches Tetrazolium
WT	Wildtyp

1. Zusammenfassung

Das Nierenzellkarzinom macht mit 90 % die häufigste Entität aller bösartigen Entartungen der Niere aus. Der Tumor ist symptomarm und wird vorwiegend als Zufallsbefund in Bildgebungen diagnostiziert. Hierbei weisen bis zu 20 % bereits bei Diagnosestellung Metastasen auf. Bis zu 30 % entwickeln metachrone Metastasen. Das Nierenzellkarzinom ist strahlenresistent und unsensibel gegen klassische Chemotherapeutika, welches im metastasierten Stadium den Einsatz von neueren Wirkstoffen wie Tyrosinkinaseinhibitoren nötig macht. Unter Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren wie Sunitinib, kann sich nach 6 – 12 Monaten eine Resistenz bilden, was die Behandlungsmöglichkeiten des Patienten beschränkt. Exosomen sind sphärische Nanopartikel mit einer Größe von 30 – 150 nm, welche über Oberflächenmoleküle und spezifische Beladung in der Zell-Zell Kommunikation beteiligt sind. Neue Erkenntnisse zeigen, dass sie aber auch als Wachstumsstimuli oder Immunmodulatoren für Tumorzellen dienen und die Weitergabe von erworbenen Resistenzen gegen Chemotherapeutika ermöglichen. Dies wurde schon für mehrere Tumorentitäten und Therapeutika, zum Beispiel Brustkrebs, nachgewiesen.

Diese experimentelle Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, welchen Effekt Exosomen von Sunitinib-resistenten Caki-2 Zellen auf die Zellviabilität von Caki-2 Wildtyp-Zellen unter Sunitinib Behandlung haben.

Um die Wirkung von Exosomen auf die Zellviabilität zu testen, habe ich Exosomen von Caki-2 Zellen mit und ohne Sunitinib Resistenz mittels Ultrazentrifugation isoliert und mithilfe von Nanotracking Analyse und Western Blot charakterisiert. Die Inokulation von Exosomen wurde mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Ich habe Caki-2 Wildtyp-Zellen mit Exosomen von Sunitinib-resistenten Caki-2 Zellen unter Therapie mit Sunitinib kultiviert und deren Zellviabilität mithilfe des WST-1 Cell Viability Assays bestimmt.

Die Partikelgröße und die Proteinbeladung stimmte mit der von Exosomen von Nierenkarzinomzellen überein. Es zeigte sich, dass Caki-2 Wildtyp-Zellen, welche mit Exosomen von Sunitinib-resistenten Zellen inkubiert wurden, eine signifikant höhere Zellviabilität unter Therapie mit Sunitinib aufwiesen als der Wildtyp, welcher Exosomen von Wildtyp-Zellen erhielt. Diese Aussage ist im Einklang mit der aktuellen Forschung, welche eine exosomal-transferierte Long-non-coding RNA als potenziellen Mediator der Sunitinib Resistenz in Nierenzellkarzinomzellen entdeckte. Diese Arbeit bestätigt die Weitergabe einer Medikamentenresistenz über Exosomen. Weitere Experimente sind jedoch nötig, um die genauen Mechanismen der Resistenzentwicklung und ein mögliches therapeutisches Ziel für die Resistenzbekämpfung herauszufinden.

1. Abstract

Renal cell carcinoma accounts for 90% of all malignant kidney tumors. The tumor has few symptoms and is mainly diagnosed as an incidental finding on imaging. In this case, up to 20 % already show metastases at diagnosis. Up to 30% develop metachronous metastases. The renal cell carcinoma is resistant to radiation and insensitive to classical chemotherapeutic agents, which necessitates the use of newer agents such as tyrosine kinase inhibitors in the metastatic stage. Under therapy with tyrosine kinase inhibitors, such as sunitinib, resistance can develop after 6 - 12 months, limiting the patient's treatment options. Exosomes are spherical nanoparticles with a size of 30 - 150 nm, which are involved in cell-cell communication via surface molecules and specific loading. However, recent findings show that they also serve as growth stimuli or immunomodulators for tumor cells and enable the transmission of acquired resistance to chemotherapeutic agents. This has already been demonstrated for several tumor entities and therapeutics, for example in breast cancer.

This experimental work addresses the question of what effect exosomes from sunitinib-resistant Caki-2 cells have on the cell viability of Caki-2 wild-type cells under sunitinib treatment.

To test the effect of exosomes on cell viability, I isolated exosomes from Caki-2 cells with and without sunitinib resistance by ultracentrifugation and characterized them using nanotracking analysis and Western blot. The inoculation of exosomes was detected using fluorescence microscopy. I cultured Caki-2 wild-type cells with exosomes from sunitinib-resistant Caki-2 cells under therapy with sunitinib and determined their cell viability using the WST-1 cell viability assay.

The particle size and protein loading were consistent with that of exosomes from renal carcinoma cells. It was found that Caki-2 wild-type cells incubated with exosomes from sunitinib-resistant cells exhibited significantly higher cell viability under therapy with sunitinib than the wild-type, which received exosomes from wild-type cells. This statement is consistent with recent research that discovered an exosomal-transferred long-non-coding RNA as a potential mediator of sunitinib resistance in renal cell carcinoma cells. This work confirms the transmission of drug resistance via exosomes. However, further experiments are needed to determine the precise mechanisms of resistance development and a potential therapeutic target for resistance.

2. Einleitung

2.1 Das Nierenzellkarzinom

2.1.1 Epidemiologie

Das Nierenzellkarzinom (NZK) ist mit 90% aller malignen Entartungen der Niere der häufigste Nierentumor und macht insgesamt ca. 2 - 3% aller Krebserkrankungen aus. In Europa und Nordamerika wird ein kontinuierlicher Anstieg der Inzidenz von ca. 2 % pro Jahr verzeichnet (Ferlay et al., 2013; Scelo & Larose, 2018). Dabei sind Männer im Verhältnis zu Frauen von 2:1 häufiger betroffen. Das durchschnittliche Alter bei Erstdiagnose liegt zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr (Padala et al., 2020). Im Jahr 2018 verstarben weltweit circa 175.000 Menschen am NZK (Bray et al., 2018). Die Mortalitätsraten in Deutschland sinken, wobei andere europäischen Staaten wie Kroatien und Estland, steigende Trends aufweisen (Ferlay et al., 2013).

2.1.2 Ätiologie

Zu folgenden Risikofaktoren gibt es wissenschaftliche Nachweise zur Rolle in der Entwicklung eines NZK. Zigarettenkonsum erhöht das Erkrankungsrisiko bei Frauen um 20%, bei Männern um 50% im Vergleich zu Nicht-Rauchern. Dabei nimmt das Risiko mit der Anzahl der konsumierten Zigaretten zu (Hunt et al., 2005). Auch Übergewicht und Adipositas tragen zu einer Risikosteigerung bei Männern und Frauen bei. Es zeigt sich eine lineare Risikozunahme von 25 % pro 5kg/m² im BMI (Body Mass Index) (Pischon et al., 2006; Scelo & Larose, 2018). Arterielle Hypertonie, Exposition zu Trichlorethylen sowie chronische Nierenerkrankungen mit Dialysepflicht stellen weitere Risikofaktoren dar (Karami et al., 2012; Lowrance et al., 2014; Weikert et al., 2008).

2.1.3 Genetische Syndrome

In den meisten Fällen tritt das NZK sporadisch auf. Es gibt jedoch genetische Syndrome, welche mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines NZK einhergehen. Ungefähr 1 - 4 % aller NZK sind hereditären Ursprungs (Pavlovich & Schmidt, 2004). Das Von Hippel Lindau Syndrom (VHL-Syndrom) folgt einem autosomal-dominanten Erbgang und tritt im jungen Erwachsenenalter auf. Die Patienten weisen Hämangiome der Retina, Hämangioblastome im

ZNS, Phäochromozytome, sowie bilaterale klarzellige NZK auf (Maher et al., 1990). 25 – 45 % der Patienten entwickeln im Laufe ihres Lebens ein NZK (Vogelzang & Stadler, 1998).

Für das sporadische sowie für das VHL-assoziierte klarzellige NZK konnten Mutationen und/oder Promotormethylierung des Von Hippel Lindau Gens (*VHL*) nachgewiesen werden (Latif et al., 1993). Hierbei handelt es sich um ein Tumorsuppressor-Gen, welches im Genlokus 3p25.3 lokalisiert ist. Nach Knudsons Zwei-Treffer Theorie ist neben der primären Mutation der Funktionsverlust des zweiten Allels des *VHL*-Gens für die Karzinogenese des NZK notwendig. Dies geschieht über erlangte Mutationen, durch exogene Karzinogene oder durch die Deletion des kurzen Arms des Chromosoms 3, auf dem sich der *VHL* Genlokus befindet. (Moore et al., 2012; Zbar et al., 1987). Von 110 Patienten mit sporadischen klarzelligen Nierenzellkarzinom zeigten 57 % eine Mutation des Gens *VHL* auf (Gnarra et al., 1994). Weitere identifizierte Gene in der Tumorgenese des klarzelligen Nierenzellkarzinoms sind *PBRM1* und *SETD2* (Brugarolas, 2014). Das papilläre Nierenzellkarzinom tritt innerhalb der familiären Leiomyomatose auf, ist jedoch auch ohne genetisches Syndrom vererbbar (Coleman, 2008). Bei Patienten mit Birt-Hogg-Dubé-Syndrom treten neben zahlreichen Fibrofollikulomen und zystischen Veränderungen der Lunge und Niere auch Nierentumoren, wie das chromophobe Nierenzellkarzinom auf (Pavlovich et al., 2002).

2.1.4 Klassifikation

Das NZK wird nach der WHO-Klassifikation und ergänzend mit der Vancouver-Klassifikation der Internationalen Gemeinschaft der urologischen Pathologie (ISUP) in seine histologischen Subtypen eingeteilt (Delahunt et al., 2013; Moch et al., 2022). Mit einer Häufigkeit von 75 % ist das klarzellige NZK der häufigste Subtyp. Es folgen das papilläre NZK mit einer Inzidenz von 10 % und das chromophobe NZK mit 5 %. Seltenerer Subtyp ist das Ductus Bellini NZK (<1 %) (Muglia & Prando, 2015). Im Folgenden werden die drei häufigsten Entitäten erläutert.

Das klarzellige Nierenzellkarzinom

Ausgehend vom Epithel des proximalen Tubulussystems bildet das klarzellige NZK den häufigsten Subtyp aller NZK. Makroskopisch grenzt sich der solide Tumor vom Nierengewebe ab und präsentiert sich gelblich mit zentralen-nekrotischen Arealen, Hämorrhagien und zystischen Degenerationen (Pedrosa et al., 2008). Kalzifikationen des Tumors werden beschrieben. Histologisch zeigen sich Zellen mit klarem Zytoplasma, aufgrund des hohen Lipid- und Glykogengehalts, sowie Zellen mit eosinophil-granuliertem Zytoplasma. Charakteristisch sind die dünnwandigen, verzweigten Blutgefäße um die alveolären und

azinösen Strukturen (Prasad et al., 2006).

Das papilläre Nierenzellkarzinom

Das papilläre NZK geht von dem proximalen Tubulusepithel aus. Makroskopisch zeigt sich ein solider, gut abgrenzbarer Tumor zum gesunden Nierengewebe mit gelb-brauner Schnittfläche. Kalzifikationen und Hämorrhagien wurden beschrieben. Im Vergleich zum klarzelligem NZK ist es jedoch homogener und weniger vaskularisiert (Prasad et al., 2006). Histologisch weist es eine papilläre und tubuläre Struktur auf. Die weitere histologische Einteilung in Typ 1 und Typ 2 von Delahunt und Eble wurde aufgrund von neuen Erkenntnissen nicht in die neue WHO-Klassifikation mit aufgenommen (Moch et al., 2022).

Das chromophobe Nierenzellkarzinom

Das chromophobe NZK geht von Zellen des kortikalen Teils des Sammelrohres aus. Es handelt sich um einen soliden Tumor von einem oder mehreren Knoten. Das Schnittbild erscheint homogen von hellbrauner Farbe. Mikroskopisch zeigt sich ein solides, kompaktes Wachstumsmuster mit prominenten Zellmembranen. Das Bild wird von großen, polygonalen Zellen mit transparentem Zytoplasma und hyperchromatischen, gewinkelten Nuklei geprägt (Algaba et al., 2011). Es zeigen sich auch perinukleäre Halo. Die Blaufärbung des Zytoplasmas durch die Eisenfärbung nach Hale ist ein Charakteristikum und wird als diagnostisches Mittel verwendet (Prasad et al., 2006; Störkel et al., 1997).

Klinische Stadieneinteilung

Für die klinische Klassifikation des NZK wird die Tumor-Nodes-Metastasis-Klassifikation (TNM) der Union für Internationale Krebsbekämpfung (UICC) in Zusammenarbeit mit der Gemeinsamen Amerikanischen Kommission für Krebserkrankungen (AJCC) verwendet. Die neueste Version stammt aus dem Jahre 2017 und ist in Tabelle 1 dargestellt. Ziel ist es, den Tumor in standardisierten Kriterien zu charakterisieren und damit Aussagen über die Prognose und daraus ableitend für die Therapie zu treffen. Dabei steht das T-Stadium für die Größe und Ausdehnung des Primärtumors. Das N-Stadium beschreibt das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen bei lymphogener Streuung. Und das M-Stadium beschreibt den Nachweis von Fernmetastasen (Brierley et al., 2017).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation maligner Nierentumoren, 8. Auflage (2017)

T-Stadium: Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumorgröße 7 cm oder kleiner, auf die Niere begrenzt
T1a	Tumor 4 cm oder kleiner in seiner größten Ausdehnung
T1b	Tumor größer als 4 cm, aber kleiner als 7 cm in seiner größten Ausdehnung
T2	Tumor größer als 7 cm, auf Niere begrenzt
T2a	Tumor größer als 7 cm, aber kleiner als 10 cm in seiner größten Ausdehnung
T2b	Tumor größer als 10 cm, auf Niere beschränkt
T3	Tumor infiltriert in Nierenvene oder perirenales Gewebe, aber nicht in ipsilaterale Nebenniere und über Gerota Faszie hinaus
T3a	Tumor infiltriert die Nierenvenen oder perirenal und/oder peripelvines Fett, aber nicht über Gerota Faszie hinaus
T3b	Tumor infiltriert makroskopisch in V. cava unterhalb des Zwerchfells
T3c	Tumor infiltriert makroskopisch V. cava oberhalb des Zwerchfells oder die Wand der V. cava
T4	Tumor infiltriert über Gerota Faszie hinaus
N-Stadium: regionale Lymphknoten	
NX	Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in regionalen Lymphknoten
M-Stadium: Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastase
M1	Fernmetastase

Regionale Lymphknoten sind in der Klassifikation als hiliäre, abdominal paraaortale und paracavale Lymphknoten definiert. Lymphknotenmetastasen sind im Durchschnitt bei ca. 20 % aller metastasierten Fälle nachzuweisen. Fernmetastasen des NZK treten meist multifokal auf. Am häufigsten sind dabei die Lunge (45,2 %), Knochen (29,5 %), Leber (20,3 %) und das Gehirn (8,1 %) betroffen (Bianchi et al., 2012).

Um eine genauere prognostische Aussage für die Patienten treffen zu können, wurde von der UICC ergänzend eine Stadieneinteilung von TNM-Clustern entworfen. Dabei wird die Prognose mit aufsteigenden Stadien schlechter (Tabelle 2).

Tabelle 2: UICC-Stadien maligner Nierentumoren, 8. Auflage (2017)

UICC-Stadien	TNM-Klassifikation
Stadium I	T1 N0 M0
Stadium II	T2 N0 M0
Stadium III	T3 N0 M0
	oder T1-3 N1 M0
Stadium IV	T4 N0 M0
	oder T1-4 N0-1 M1

Für die histologische Graduierung des klarzelligen und papillären NZK wird seit dem Konsensus der ISUP im Jahre 2012 das ISUP-Graduierungssystem verwendet. Hierbei wird die Beschaffenheit der Nukleoli in Grade eingeteilt, welche Auskunft über die Prognose geben (Tabelle 3). Dabei ist ein höherer Grad mit einer schlechteren Prognose verbunden (Delahunt et al., 2013).

Tabelle 3: ISUP-Graduierung des klarzelligen und papillären NZK (Delahunt et al., 2013)

ISUP-Grad	Histologie
Grad I	Fehlende oder unauffällige Nukleolen in 400-facher Vergrößerung
Grad II	Prominente Nukleolen bei 400-facher Vergrößerung
Grad III	Prominente Nukleolen bei 100-facher Vergrößerung
Grad IV	Tumore mit rhabdoider/sarkoider Differenzierung, Tumorriesenzenzellen, extreme nukleäre Pleomorphien

2.1.5 Symptomatik und Diagnosen

Das NZK präsentiert sich in vielen Fällen symptomarm, dabei werden über 50 % der NZK als Zufallsbefund bei nicht invasiven bildgebenden Verfahren erkannt (Novara et al., 2010). Flankenschmerz, Makrohämaturie und ein palpabler Tumor gelten als klassische Symptomatik im fortgeschrittenen Stadium, treten jedoch bei weniger als 15 % der Patienten auf (Palapattu et al., 2002). Auch unspezifische Symptome wie Fieber, Abgeschlagenheit, Gewichtsverlust und Anämie können auftreten. Knochenschmerz, Lymphadenopathien und pulmonale

Beteiligung weisen auf eine bereits metastasierte Krankheit hin (Motzer, Agarwal, et al., 2009). Im Rahmen des NZK treten bei ca. 30 % aller symptomatischen Patienten paraneoplastische Syndrome auf (Kim et al., 2003). Die häufigsten Symptome sind hierbei Hyperkalzämie, Hypertension und Polycythämie. Das Stauffer-Syndrom beschreibt eine hepatische Dysfunktion bei NZK Patienten und geht mit Gerinnungsstörungen, Hepatosplenomegalie und Erhöhung der Leberwerte im Blut einher (Palapattu et al., 2002).

Die körperliche Untersuchung hilft bei der Erkennung von palpablen Tumoren, Lymphadenopathien und Varicocele testis. Es gibt keinen speziellen Biomarker zur Erkennung des NZK, jedoch gehören Serumkreatinin, die glomeruläre Filtrationsrate (GRF), Leberfunktionswerte, Blutbild und Urinanalyse zum diagnostischen Prozedere. Die maßgeblich wegweisende Diagnostik beim NZK stellen bildgebende Verfahren wie abdomineller Ultraschall, Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) dar. Dabei hat sich die CT nativ oder mit Kontrastmittel als Standardverfahren für die Charakterisierung des Tumors etabliert (Leitlinienprogramm Onkologie Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, 2023). Bei Kontrastmittelunverträglichkeit, Schwangerschaft oder bei Verdacht auf Cavazapfen kann die MRT eingesetzt werden. Für das Staging kann zusätzlich eine CT des Thorax durchgeführt werden, um Metastasierungen des NZK zu erkennen (Leitlinienprogramm Onkologie Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, 2023; Ljungberg et al., 2021). Eine Tumorbiopsie dient der histopathologischen Sicherung der Diagnose und des Subtypus bei Patienten mit unklarem Befund oder im metastasierten Stadium. Eine Tumorbiopsie sollte nur dann erfolgen, wenn sie einen Einfluss auf die Therapieentscheidung hat (Leitlinienprogramm Onkologie Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, 2023).

2.1.6 Therapie

Allgemein sind die Therapieoptionen des NZK in kurativ und palliativ zu unterteilen. Lokal begrenzte Tumoren werden operativ entfernt, im metastasierten Stadium wird eine systemische Therapie empfohlen.

Operative Therapie

Aufgrund der geringen Sensitivität des NZK gegenüber Radiatio und Chemotherapeutika stellen die radikale Tumornephrektomie und die nierenerhaltende Nierenteilresektion die kurativen Behandlungsoptionen dar. Beide Verfahren können offen-chirurgisch oder laparoskopisch durchgeführt werden (Ljungberg et al., 2021). Bei der radikalen

Tumornephrektomie zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Gesamt- und tumorspezifischen Überleben zwischen diesen Techniken (Hemal et al., 2007). Die Nierenteilresektion wird standardmäßig offen-chirurgisch bei lokal begrenzten Tumoren im T1 und T2 Stadium durchgeführt (Leitlinienprogramm Onkologie Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, 2023). Sie kann nicht angewandt werden, wenn das zu erhaltene Nierengewebe nicht ausreicht, um eine hinreichende Nierenfunktion zu gewährleisten. Auch venösen Thromben und ungünstige Tumorlokalisationen stellen eine Kontraindikation dar. In diesen Fällen ist die minimal-invasive radikale Nephrektomie Therapie der Wahl (Ljungberg et al., 2021). Eine adjuvante Lymphadenektomie wird nur bei Patienten mit in der Bildgebung vergrößerten Lymphknoten empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, 2023). Es konnte kein signifikanter Vorteil einer extendierten Lymphadenektomie für Patienten ohne Verdacht auf Lymphknotenmetastasen festgestellt werden (Bekema et al., 2013; Crispen et al., 2011). Bei Infiltration des Tumors in die Nebenniere oder suspekten Befund in der Bildgebung wird eine ipsilaterale Adrenalektomie durchgeführt. Die Entfernung der Nebenniere, auch bei Tumoren am oberen Nierenpol, ist jedoch nicht routinemäßig durchzuführen (Lane et al., 2009). Ablative Therapien, wie Kryoablation oder Radiofrequenzablation können alternativ bei Patienten mit kleinen Tumoren und hohen Komorbiditäten angewandt werden (Leitlinienprogramm Onkologie Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, 2023)

Systemische Therapie

Klassische zytotoxische Chemotherapeutika zeigten sich in der Behandlung des NZK als nicht ausreichend wirksam (Gottesman et al., 2002). Bis zum Jahre 2006 galt deshalb die Immuntherapie mit Zytokinen als Standardverfahren bei fortgeschrittenen oder metastasierten NZK. Die Therapie mit den Zytokinen Interferon-alpha (INF- α) und Interleukin-2 (IL-2) zeigte eine Ansprechrate bei 10 - 20 % der behandelten Patienten (Figlin, 1999; Motzer et al., 2000). Mit der Einführung von Therapeutika mit zielgerichteten Wirkungsmechanismen (Targeted Therapies) konnten bessere therapeutische Ergebnisse erzielt werden. Dazu zählen: Immunocheckpointinhibitoren (CPI), Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI), mTor-Inhibitoren und Antikörper gegen VEGF. Abbildung 1 fasst die Wirkmechanismen und Therapeutika zusammen.

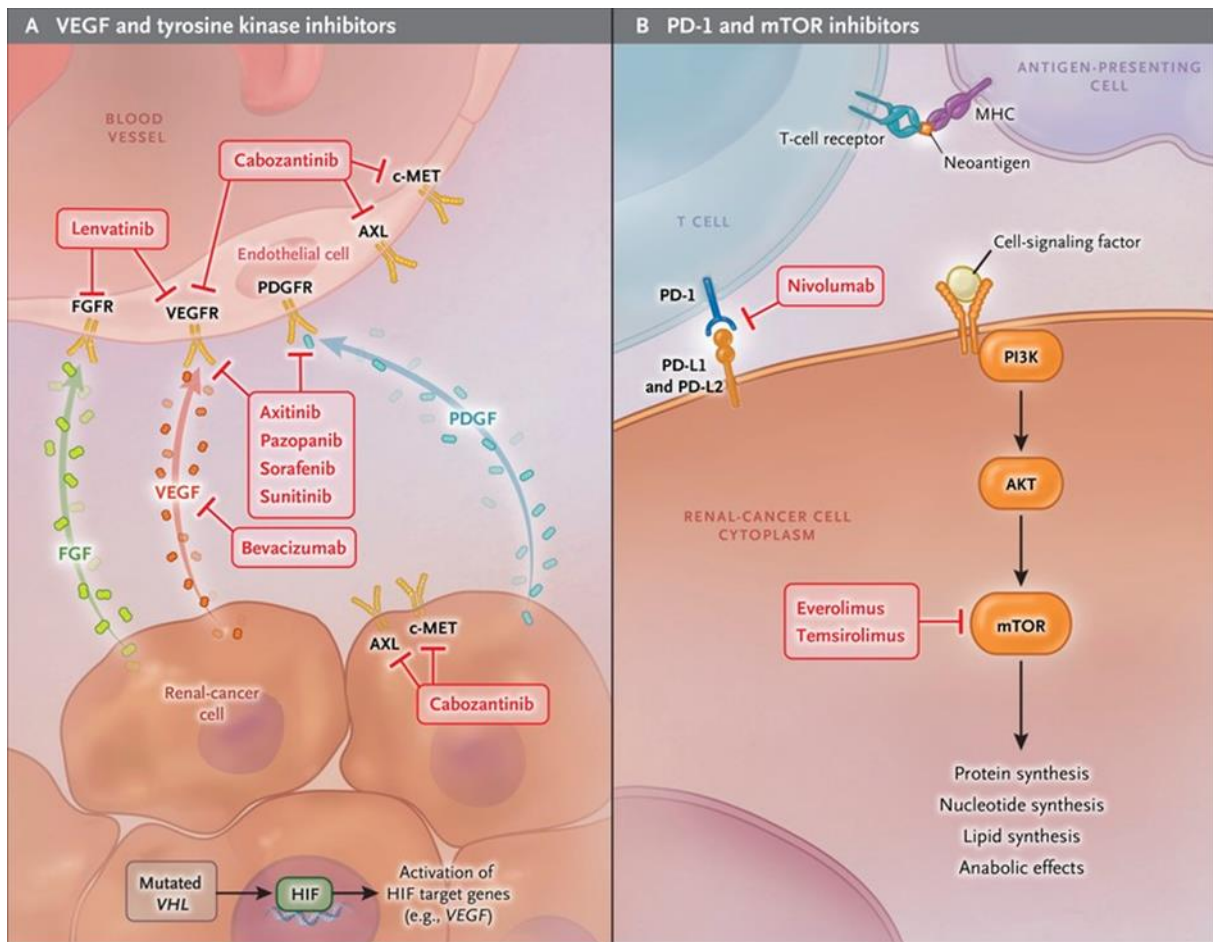


Abbildung 1: Signalwege und Medikamente des metastasierten Nierenzellkarzinoms, adaptiert von Choueiri, 2017. **A:** Durch Deregulation des HIF-Signalweges in NZK-Zellen kommt es zur vermehrten Bildung von VEGF, PDGF und FGF, welche über ihre Rezeptoren in Endothelzellen die Angiogenese anregen. Die Therapeutika verhindern über direktes Binden an den Signalmolekülen oder ihren Rezeptoren diesen Effekt. **B:** PD-1-Inhibitoren wie Nivolumab binden PD1 und verhindern somit den zytotoxischen Effekt auf T-Zellen von PD-L1 der NZK-Zelle. MTOR-Inhibitoren hemmen den mTORC1-Komplex im PI3K/Akt-Signalweg, welcher in NZK-Zellen einen anabolen Stoffwechsel initiiert.

Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) und VEGF-Antikörper

Angiogenese und Zellwachstum sind im menschlichen Körper stark regulierte Prozesse. Es zeigte sich, dass der Hypoxia-Inducible-Factor-Signalweg (HIF) eine entscheidende Funktion in der Regulation der Angiogenese in humanen Zellen einnimmt (Maxwell et al., 2001). Im NZK und anderen Tumorentitäten ist dieser Signalweg durch fehlende Suppression und/oder Überexpression verstärkt aktiviert (Shen & Kaelin, 2013).

Das Gen *VHL* ist ein Tumor Suppressor Gen und kodiert für ein Protein namens pVHL, welches einen Ubiquitin- Ligase-Komplex mit Elongin-B, Elongin-C, Cul-2 und RBx1 bildet. Unter Normoxie bindet dieser Komplex die α -Untereinheiten des Transkriptionsfaktors HIF und führt zu dessen Abbau durch Proteasomen (Maxwell et al., 1999; Shen & Kaelin, 2013). Unter hypoxischen Bedingungen oder Ausfall bzw. Verminderung der Funktion von pVHL dimerisieren HIF- α und HIF- β und wirken als Transkriptionsfaktoren für bis zu 200 Gene, wie zum Beispiel *EPO*, *VEGF*, *PDGF* und Proteine des Glucosestoffwechsels (Semenza, 2011).

Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die Ziel-Gene von HIF. Sato et al konnten eine VHL-Komplex Inaktivierung bei 92 % von 106 untersuchten Fällen mit kleinzelligem NZK nachweisen. Dabei handelte es sich in 66 % der Fälle um *VHL* Mutationen. Bei 21 % lag eine Methylierung des Gens *VHL* vor (Sato et al., 2013).

Tabelle 4: Funktions- und Regulationsgene von HIF, adaptiert nach Maxwell et al. (2001)

Identifizierte HIF Ziel-Gene
Erythrozythensynthese Erythropoetin
Eisenstoffwechsel Transferrin, Transferrin-Rezeptor, Caeruloplasm in
Regulation der Angiogenese Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), VEGF Rezeptor-1, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1, Adrenomedullin, Endothelin-1, Stickstoffoxidsynthase-2 (NO-Produktion), Hämoxygenase-1 (CO-Produktion), α 1B- Adrenorezeptor
Glukose- und Energiemetabolismus Glukosetransporter-1, Glukosetransporter-3, Hexokinase-1, Hexokinase-2, Phosphofruktokinase-L, Aldolase-A, Aldolase-C, Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Phosphoglycerat-Kinase-1, Enolase-1, Pyruvat-Kinase-M, Lactat-Dehydrogenase-A, Adenylat-Kinase-3
Zellproliferation und Differenzierung Insulin-like growth factor binding protein-1 und -3 (IGFBP), Insulin-like growth factor II, Transforming growth factor- β 3, p21, Nip3, Cyclin G2
pH Regulation Carboanhydrase-9 und -12
Zellmatrix Prolyl-4-Hydroxylase- α 1, Kollagentyp-V- α 1

Im NZK kommt es unter anderem durch die pathologische Funktionsweise von HIF zu einer Überexpression von VEGF (Shen & Kaelin, 2013). Physiologischerweise spielt VEGF eine wichtige Rolle in der embryonalen Vaskulo- und Angiogenese, insbesondere in der Entwicklung der Nieren sowie im Skelettwachstum und der endochondralen Knochenbildung (Eremina et al., 2003; Ferrara et al., 1996; Haigh et al., 2000). VEGF wirkt über membranständige Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Dabei unterscheidet man zwischen VEGFR-1 und VEGFR-2, welche auf Gefäßendothelzellen exprimiert werden, VEGFR-3 und Neuropilin-Rezeptoren (Dvorak, 2002). VEGFR-2 ist der Rezeptor mit dem größten proangiogenen Effekt (Rini & Small, 2005). Durch Binden von VEGF an den extrazellulären Rezeptoren der Tyrosinkinase dimerisiert diese und führt durch Autophosphorylierung zur Aktivierung

nachstehender Signalmoleküle wie PI3K oder Raf (Ferrara et al., 2003). Neben des proangiogenen Effektes auf Endothelzellen über die parakrine Sekretion von VEGF wirkt der Faktor auch autokrin auf die sezernierende Ursprungszelle (Wiszniak & Schwarz, 2021). In Zellen des NZK fördert autokrin-sezerniertes VEGF über Neuropilin-1-Rezeptoren (Nrp-1) das Tumorstadium (Cao et al., 2012).

Bevacizumab ist ein rekombinanter monoklonaler Antikörper, welcher VEGF bindet und somit die Wirkung an seinen Rezeptoren verhindert. Es zeigte sich in Kombination mit INF- α ein verlängertes progressionsfreies Überleben bei Patienten mit metastasierten NZK im Vergleich zu Patienten, welche nur mit INF- α behandelt wurden (Rini et al., 2008).

Neben der direkten VEGF-Inhibition durch Antikörper stellen TKI eine wichtige Therapieoption in der Behandlung des NZK dar. Diese inhibieren nicht nur VEGFR, sondern auch andere Rezeptoren wie PDGFR, FGFR, AXL oder MET (Alonso-Gordo et al., 2019). Auf den bekanntesten TKI Sunitinib wird hier in einem eigenen Abschnitt eingegangen.

Sunitinib

Sunitinib (Sunitinib-Malat, SU11248, Sutent (Pfizer)) ist ein Oxindol-Derivat und Multityrosinkinaseinhibitor, welcher über die selektive Inhibition von VEGFR1-3, PDGFR- β und anderen Kinasen wie KIT, FLT3, RET und CSF1R hemmend auf Angiogenese und Zellproliferation wirkt (Chow & Eckhardt, 2007). In präklinischen Studien konnte Sunitinib effektiv das Wachstum von Zelllinien, welche durch VEGF, PDGF und Stem Cell Factor (SCF) stimuliert wurden, hemmen und induzierte bei einer Konzentration von > 50 ng/ml die Apoptose von humanen Endothelzellen der Umbilicalvene (Mendel et al., 2003). In vivo Studien mit Tieren zeigten, dass ein Plasmaspiegel von $50 - 100$ ng/ml des aktiven Metaboliten SU12662 und Sunitinib die Phosphorylierung von VEGFR-2, PDGFR- β und KIT und somit deren Aktivierung inhibiert (Abrams et al., 2003; Mendel et al., 2003). Klinische Studien belegen den antiproliferativen Effekt von Sunitinib auf unterschiedliche Tumorentitäten wie das NZK oder gastrointestinale Stromatumoren (GIST) (Motzer et al., 2006). In einer Phase 3 Studie wurde Sunitinib mit INF- α bei Patienten mit metastasierten NZK verglichen. Sunitinib zeigte eine Ansprechrate von 31 % im Vergleich zu INF- α mit 6 % der analysierten Patienten. Das mediane progressionsfreie Überleben war hierbei mit 11 Monaten signifikant länger als bei INF- α (5 Monate) (Motzer et al., 2007). Im Jahre 2007 wurde es durch die europäische Arzneimittel Agentur für die Behandlung von Patienten mit metastasierten NZK zugelassen und wurde bis 2020 als Erstlinientherapeutikum empfohlen. Heute stellt es eine Option zur Erstlinientherapie in allen drei Risikogruppen dar (Leitlinienprogramm Onkologie Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, 2023). Das 4/2- Therapieschema sieht eine tägliche orale Applikation von 50 mg Sunitinib für 4 Wochen vor, gefolgt von 2 Wochen Therapiepause. Alternativ kann auch

das 2/1- Schema bei gleichbleibender Sunitinibkonzentration angewandt werden. Es zeigte sich, dass dieses im Gegensatz zum 4/2-Schemata mit einer geringeren Toxizität einhergeht, ohne dabei die objektive Ansprechrate zu beeinflussen (Lee et al., 2015). Bei regelmäßiger Reevaluation der Patienten werden diese Zyklen wiederholt durchgeführt. Häufige Nebenwirkungen sind Hypertension, Diarrhö und Fatigue. Desweiteren kommt es zur palmarplantaren Erythrodyästhesie (Hand-Fuß-Syndrom) und Veränderungen des Blutbildes, wie Thrombozytopenie und Leukopenie (Alonso-Gordoa et al., 2019).

Weitere Tyrosinkinaseinhibitoren

Axitinib ist ein selektiver Inhibitor der Tyrosinkinasen VEGFR1-3 und gehört zur zweiten Generation der TKI (Y. Chen et al., 2013). Die Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem NZK in der Zweitlinientherapie zeigte ein signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben im Vergleich zu Sorafenib (Rini et al., 2011). In Kombination mit dem Checkpointinhibitor Pembrolizumab stellt es eine Empfehlung der Erstlinientherapie in allen Risikogruppen beim metastasierenden NZK dar (Leitlinienprogramm Onkologie Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, 2023).

Pazopanib hemmt die Tyrosinkinasen VEGFR1-3 sowie die beiden PDGFR-Subtypen PDGFR- α und PDGFR- β (Keisner & Shah, 2011). Im Vergleich zu unbehandelten Patienten und Patienten mit metastasierten NZK und vorausgegangener Zytokinbehandlung konnte sich Pazopanib im progressionsfreien Überleben signifikant durchsetzen (Sternberg et al., 2010). Im Vergleich zu Sunitinib konnte jedoch nur eine Nicht-Unterlegenheit im progressionsfreien Überleben nachgewiesen werden (Motzer et al., 2013). Es wird als Therapieoption bei metastasierten NZK in allen Risikogruppen empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, 2023).

Der Multityrosinkinaseinhibitor Cabozantinib inhibiert neben VEGFR-2 auch Tyrosinkinasen wie MET, AXL und KIT, welche wichtige Mediatoren im Zellwachstum und der Tumorpathophysiologie darstellen (Yakes et al., 2011). In einer randomisierten Phase 3 Studie zeigten Patienten mit fortgeschrittenem NZK unter Behandlung mit Cabozantinib ein verlängertes Gesamtüberleben im Vergleich zum Kontrollarm mit Everolimustherapie (Choueiri et al., 2016). Es wird in Kombination mit Nivolumab als Erstlinientherapie für Patienten in allen drei Risikogruppen empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, 2023). Ein weiterer eingesetzter Multityrosinkinaseinhibitor ist Lenvatinib. Ein Hemmer von VEGFR1-3, PDGFR, und FGFR1-4, welcher in Kombination mit Pembrolizumab in allen drei Risikogruppen als Erstlinientherapie empfohlen wird (Leitlinienprogramm Onkologie Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, 2023).

mTOR-Inhibitoren

Das mammalian Target of Rapamycin (mTOR) ist eine Serin/Threonin-Kinase und gehört zum Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) / Akt- Signalweg, welcher eine wichtige Rolle im Zellwachstum und Proliferation in eukaryotischen Zellen spielt (Pal & Quinn, 2013). Im NZK ist diese Signalkaskade hochreguliert und geht mit einer schlechten Prognose einher (Pantuck et al., 2007). Dabei ist dies auf verschiedene Mechanismen zurückzuführen. Unter anderem können Wachstumsfaktoren, Mutationen und Hochregulationen von PI3K, Akt oder der Tumor Suppressoren TSC1/2, PTEN, Von Hippel-Lindau (VHL) zu einer Hyperaktivität von mTOR führen (Meric-Bernstam & Gonzalez-Angulo, 2009). M-TOR bildet zwei unterschiedliche Multiproteinkomplexe, mTORC-1 und mTORC-2 (Zheng et al., 1995). Von besonderer Bedeutung ist hierbei mTORC-1, welcher neben der Regulation von wichtigen Proteinen der Zellproliferation, wie Cyclin-D und c-Myc, auch die Expression von HIF1- α steuert (Fingar et al., 2004; Hudson et al., 2002). Das namensgebende Rapamycin bindet an einem Protein namens FKBP-12, welches wiederum an mTORC1 bindet und es somit hemmt (Heitman et al., 1991; Sabers et al., 1995). Die m-TOR Inhibitoren Temsirolimus und Everolimus sind Rapamycin-Analoga und haben den gleichen Wirkmechanismus (G. R. Hudes, 2009). Temsirolimus zeigte im Vergleich zu INF- α ein verbessertes Gesamtüberleben bei Patienten mit metastasiertem NZK und schlechter Prognose (G. Hudes et al., 2007).

Immunocheckpointinhibitoren (CPI)

Viele Tumorentitäten neben dem NZK schaffen ein immunsuppressives Tumor-Mikromilieu im umliegenden Stroma. NZK-Zellen exprimieren an ihrer Oberfläche den Programmed-Death-Liganden-1 (PD-L1), welcher, durch Binden an den PD-1-Rezeptor, die Apoptose von aktivierten T-Zellen, insbesondere CD8⁺-T-Zellen, induziert (S. P. Patel & Kurzrock, 2015). Es zeigte sich, dass eine PD-L1-Expression bei NZK mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Thompson et al., 2006). Pembrolizumab ist ein voll humanisierter, monoklonaler Antikörper gegen PD-1. Er blockiert durch Binden an PD-1 die Funktion von PD-L1 der Tumorzelle und wirkt somit dem immunsuppressiven Mikroenvironment entgegen (Khoja et al., 2015). Die Kombination mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Axitinib war im Gesamtüberleben und progressionsfreien Überleben der Erstlinientherapie mit Sunitinib signifikant überlegen (Rini et al., 2019). Ein weiterer zugelassener IgG4-Antikörper gegen PD-1 ist Nivolumab. Dieser zeigte in Kombination mit dem Checkpointinhibitor Ipilimumab ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben und höhere Ansprechraten bei Patienten mit intermediären bis hohem Risiko im Vergleich zu Sunitinib (Motzer et al., 2018). Ipilimumab ist ein rekombinanter, humaner, monoklonaler Antikörper gegen das Cytotoxic-T-Lymphocyte-Antigen-4 (CTLA-4). Neben dem MHC-Komplex sind CD80 und CD86 Teil der Stimulation von T-Zellen durch Antigen-präsentierende-Zellen, indem sie an CD28 binden. Auf der T-Zelloberfläche

präsentiertes CTLA-4 bindet an CD80 oder CD86 und verhindert deren Stimulation und Proliferation durch Binden an CD28 (Walunas et al., 1996). Ipilimumab blockiert CTLA-4 und verhindert die immunsuppressiven Effekte (Sondak et al., 2011).

Therapieempfehlungen

Die Therapieempfehlung wird in Abhängigkeit des Risikoprofils des Patienten gestellt. Das International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium (IMDC) hat signifikante Prognosekriterien in einem Score zusammengestellt, um das Risikoprofil der Patienten zu ermitteln und zwischen den Risikogruppen möglichst akkurat differenzieren zu können (Heng et al., 2013). Die im IMDC-Score berücksichtigten Prognosekriterien sind in Tabelle 5 aufgezeigt. Die Summe der zutreffenden Kriterien ermöglicht die Einteilung in Risikogruppen mit niedrigen, intermediären und ungünstigen Risiko und gibt Auskunft über die Prognose (Tabelle 6). Die Therapieempfehlungen der Erstlinientherapie richten sich nach den ermittelten Risikogruppen. Die Auswahl der Zweittherapie ist abhängig von der erfolgten Vorbehandlung (siehe Tabelle 7).

Tabelle 5: Prognosekriterien des IMDC zur Bestimmung der Risikogruppe (Heng et al. (2013))

IMDC-Kriterien
Performance Status < 80 % (Karnofsky-Index)
Intervall von Diagnose bis zur Systemtherapie < 1 Jahr
Hämoglobinwert unterhalb des Normwertes
Hyperkalzämie
Neutrophilie
Thrombozytose

Tabelle 6: Prognose nach Risikogruppe bei Erstlinientherapie (Heng et al. (2013))

Risikogruppe	IMDC-Kriterien	Medianes Gesamtüberleben (in Monaten)
Niedriges Risikoprofil	0	43,2
Intermediäres Risikoprofil	1-2	22,5
Ungünstiges Risikoprofil	≥ 3	7,8

Tabelle 7: Systemtherapieoptionen gemäß Risikoprofil in der Erstlinientherapie nach den S3-Leitlinien der DGU (2023)

	Risikogruppe	Therapieempfehlung	Option
Erstlinie	Niedrig	Cabozantinib + Nivolumab Pembrolizumab + Axitinib Pembrolizumab + Lenvatinib *Avelumab + Axitinib	Bevacizumab + IFN Pazopanib Sunitinib Tivozanib
	Intermediär	Cabozantinib + Nivolumab Ipilimumab + Nivolumab Pembrolizumab + Axitinib Pembrolizumab + Lenvatinib *Avelumab + Axitinib	Cabozantinib Sunitinib Pazopanib Tivozanib Bevacizumab + IFN
	Ungünstig	Cabozantinib + Nivolumab Ipilimumab + Nivolumab Pembrolizumab + Axitinib Pembrolizumab + Lenvatinib *Avelumab + Axitinib	Cabozantinib Sunitinib Temsirolimus Pazopanib
Zweitlinie	Nach VEGF/R	Cabozantinib Nivolumab	Lenvatinib + Everolimus Alternativ: anderer TKI
	Nach CPI, CPI und TKI	-	TKI-basierte Therapie
	Temsirolimus	-	TKI, Nivolumab
IFN: Interferon, VEGF/R: Vascular endothelial Growth Factor / Receptor, CPI: Checkpointinhibitor, TKI: Tyrosinkinaseinhibitor * für diese Therapieoption liegen noch keine eindeutigen Überlebensdaten vor			

2.1.7 Resistenzentwicklung gegen Tyrosinkinaseinhibitoren

Die zielgerichtete Hemmung der Angiogenese durch Blockade des HIF/VEGF-Signalweges revolutionierte die Therapie des metastasierten NZK. TKI wie Sunitinib, Sorafenib, Pazopanib und Axitinib, sowie der VEGF-Antikörper Bevacizumab konnten sich gegenüber der Therapie mit Zytokinen gemessen an der objektiven Ansprechrate und dem progressionsfreien Überleben durchsetzen und bilden neben weiteren Targeted Therapies wie CPI und mTOR-Inhibitoren eine Option der Standardtherapie (Buczek et al., 2014). Es zeigte sich jedoch, dass nach einer Therapiedauer von 6 bis 15 Monaten eine Resistenz gegenüber TKI entstehen kann, welche den Wechsel auf ein anderes Präparat notwendig macht (Rini & Atkins, 2009).

Die molekularen Mechanismen, welche einer Resistenz gegenüber TKI zugrunde liegen, sind noch nicht vollends erforscht und sind Teil aktueller Forschungen. Allgemein unterscheidet man jedoch zwischen einer intrinsischen, also primären und einer erworbenen (sekundären) Resistenz (Bergers & Hanahan, 2008). Die primäre Resistenz zeichnet sich klinisch durch ein durchgängiges Therapieversagen mit kontinuierlicher Tumorprogression aus. Es werden VEGFR-Polymorphismen, individuelle Pharmakokinetik, sowie proangiogene, immunmodulatorische Mechanismen als mögliche Verursacher vermutet (Buczek et al., 2014). Die erworbene Resistenz stellt eine Reaktion der Tumorzelle dar, durch Genregulation oder Genmutation, die VEGFR-Inhibition zu umgehen. Zu den grundlegenden Mechanismen der sekundären Resistenzbildung im NZK gehört die Aktivierung der Angiogenese durch alternative Signalwege, die erhöhte Perizytenzahl um Blutgefäße, die Rekrutierung von proinflammatorischen Zellen aus dem Knochenmark sowie die zunehmende Invasivität von Tumorzellen in gesundes Gewebe (Bergers & Hanahan, 2008).

2.2 Extrazelluläre Vesikel

2.2.1 Definition und Klassifikation

Extrazelluläre Vesikel (EV) sind eine heterogene Gruppe von sphärischen Nanopartikeln mit einer Doppellipidschicht. Sie werden von allen eukaryotischen und prokaryotischen Zellen in den Extrazellulärraum (EZR) abgegeben und sind in allen Körperflüssigkeiten des Menschen nachweisbar (van der Pol et al., 2012). Die Funktionen der EV sind vielfältig und in Abhängigkeit von ihrem Inhalt unterschiedlich. Dabei spielen sie über den Transport von Proteinen, Lipiden oder Nukleinsäuren in Form von DNA, RNA und ihren Untergruppen sowie Oberflächenrezeptoren eine Rolle in der Zell-Zell-Kommunikation, Zell-Adhäsion, Abgabe von Giftstoffen und Koagulation (van der Pol et al., 2012; Yáñez-Mó et al., 2015). Aufgrund der

uneinheitlichen Nomenklatur von Vesikeln in aktuellen Publikationen empfiehlt die Internationale Gemeinschaft für Extrazelluläre Vesikel (ISEV) eine einheitliche Verwendung des Begriffs EV. Desweiteren sollte eine Einteilung in Subtypen nach charakterisierbaren Merkmalen der EV wie die Partikelgröße (kleine EV, medium/große EV), die Dichte, Markerproteine oder Biogenese vorgenommen werden (Théry et al., 2018). Kleine EV haben eine Größe von 50 – 150 nm. Hierzu zählen Exosomen mit endosomalen Ursprung. Große EV sind eine heterogene Gruppe mit einer Größe von 150 – 1000 nm, welche direkt von der Plasmamembran in den EZR abgegeben werden.

2.2.2 Exosomen

Exosomen bilden eine Subgruppe der EV und sind Nanopartikel mit einer Größe von 30 – 150 nm. Im Gegensatz zu medium/großen EV werden sie intrazellulär in Endosomen gebildet. Durch Invagination der Endosomenmembran bilden sich multiple intraluminale Vesikel (Huotari & Helenius, 2011). Dieser multivesikuläre Körper (MVB) fusioniert entweder mit einem Lysosom, was zur Degradation der Vesikel führt, oder direkt mit der Zellmembran, was in der Abgabe der Vesikel in den EZR resultiert (Patil & Rhee, 2019). Die Morphogenese der MVB wird durch die ESCRT-Komplexe 0 – 3, sowie die Proteine VPS-4, VTA-1 und ALIX vermittelt (Hanson & Cashikar, 2012). Dabei dient die kovalente Bindung von Ubiquitin an Membranproteinen als Sortiermechanismus für die Internalisation von Proteinen (Piper & Lehner, 2011). ESCRT-0 bindet die markierten Proteine und initiiert über Aktivierung der anderen ESCRT-Komplexe, Membrandeformationen und letztendlich die Bildung von intrazellulären Vesikeln und MVB (Henne et al., 2011). Weitere ESCRT-unabhängige Mechanismen über Ceramide oder Tetraspanine sind beschrieben (Escola et al., 1998; Trajkovic et al., 2008). Die Beladung der sezernierten Exosomen ist von der Ursprungszelle abhängig und spiegelt einen Teil ihres molekularen Inhaltes wider (Tkach & Théry, 2016). Transmembranproteine wie die Tetraspanine CD9, CD63 und CD81 sind auf Exosomen zu finden und dienen neben anderen häufigen Proteinen, wie Hitze-Schock Protein-8, Aktin, Flotillin oder Proteinen des ESCRT-Komplexes als Biomarker (Mathivanan & Simpson, 2009). Desweiteren lassen sich MHC-I-Komplexe auf Exosomen nachweisen (Blanchard et al., 2002). Neben Proteinen und Lipiden sind Nukleinsäuren in Form von DNA, mRNA, miRNA und anderer non-coding-RNA ein wichtiger Bestandteil von Exosomen und deren Funktionsweise (Sato-Kuwabara et al., 2015). Abbildung 2 stellt die Entstehung und Charakteristika von Exosomen und größeren EV dar. Die Aufnahme von Exosomen erfolgt über die Fusion mit der Membran der Zielzelle oder Endozytose. Dabei unterscheidet man zwischen mediatorabhängiger Endozytose wie der Clathrin-abhängige Endozytose, der Pinozytose und

der Phagozytose (Abels & Breakefield, 2016). Desweiteren können sie über membranständige Rezeptoren und Liganden mit Zellen interagieren (Colombo et al., 2014). Physiologischerweise sind Exosomen in der Zell-Zell-Kommunikation und Signalübertragung, Entwicklung und Differenzierung von Stammzellen sowie Geweberegeneration involviert (H. Rashed et al., 2017). Durch Expression von MHC-Komplexen können sie Immunzellen aktivieren und wirken über den Transfer von Antigenen immunmodulatorisch (Simhadri et al., 2008; Zitvogel et al., 1998). Es zeigte sich jedoch, dass Exosomen auch an pathologischen Prozessen, insbesondere an der Genese, Stoffwechsel und Metastasierung von Tumoren beteiligt sind (Patil & Rhee, 2019; Y. Zhang & Wang, 2015). Beispielsweise konnte ein vermehrter Transfer von Onkoproteinen wie MET in Exosomen von Melanomzellen nachgewiesen werden, welche den Stoffwechsel von Progenitorzellen des Knochenmarks protumorös veränderten (Peinado et al., 2012). Desweiteren spielen sie eine Rolle in der Immunsuppression und der Entwicklung eines tumorösen Mikroenvironments durch Transformation von Stromazellen wie Fibroblasten oder Makrophagen (Noy & Jeffrey, 2014; Ringuette Goulet et al., 2018; Whiteside, 2016). Die vermehrte Abgabe von Exosomen von Tumorzellen aus intratumoralen, hypoxischen Arealen, führen zu einer Stimulation der Angiogenese in Endothelzellen (Kucharzewska et al., 2013; Park et al., 2010). Sie induzieren vaskuläre Permeabilität (vascular leakyness) und pre-metastatische Nischen in entfernten Organen und ermöglichen einen Informationstransfer zwischen Primärtumor und Metastase über die Blutbahn (Hoshino et al., 2015; Zeng et al., 2018).

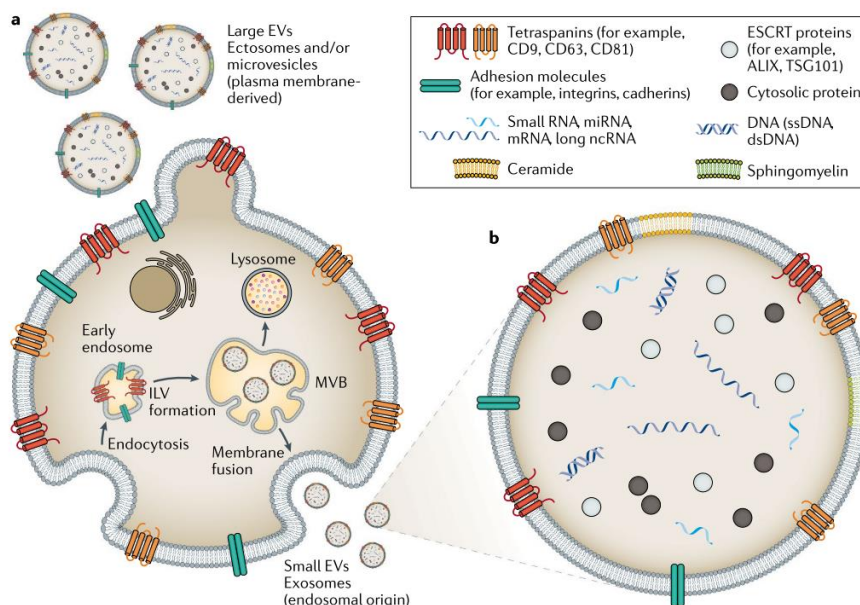


Abbildung 2: Entstehung und Charakteristika von EV adaptiert von Linxweiler & Junker, 2020. **A:** Large EVs (Mikrovesikel) werden direkt von der Plasmamembran abgeschnúrt und in den EZR abgegeben. Small EVs (Exosomen) sind endosomalenen Ursprungs. Im MVB werden diese entweder lysosomal degradiert oder über Fusion mit der Plasmamembran in den EZR abgegeben. **B:** Struktur und Inhalt von Exosomen. Exosomen tragen in ihrer Doppellipidschicht Tetraspanine und Adhäsionsmoleküle. Die Beladung ist zellspezifisch und besteht aus Nukleinsäuren (DNA, miRNA, lncRNA), sowie cytosolischen Proteinen und Proteinen des ESCRT-Komplexes.

2.2.3 Rolle in der Resistenzentwicklung

Therapieresistenz beschreibt die reduzierte Effektivität einer antineoplastischen Therapie. Die erworbene (extrinsische) Resistenz zeichnet sich durch die Interaktion der Tumorzelle mit umliegenden Zellen aus, welche über den Austausch von Botenstoffen wie RNA, die Genexpression tumorfördernd verändern (Meads et al., 2009; Valadi et al., 2007). Exosomen fördern die Resistenzentwicklung und deren Transfer an Therapie-sensitive Zellen unter anderem über Reduktion der intrazellulären Medikamentenkonzentration, Beeinflussung des Zellzyklus, sowie immunmodulatorische Mechanismen (Steinbichler et al., 2019). Extrazelluläre Vesikel sind durch ihre vielseitige Funktionsweise und spezifische Beladung in den Fokus der aktuellen Forschung gerückt (Théry et al., 2018). Die Rolle von EV in der Resistenzentwicklung gegenüber antineoplastischen Therapien ist jedoch noch nicht vollends aufgeklärt.

3. Ziel der Arbeit

Durch die Einführung der Targeted Therapies in das Therapiekonzept des metastasierten NZK konnte ein signifikant verbessertes Überleben im Vergleich zur vorherigen zytokinbasierten Therapie erreicht werden. Der TKI Sunitinib wird hierbei als Option in der Erstlinientherapie eingesetzt. Es zeigte sich jedoch, dass sich nach einem Therapieregime von 6 bis 15 Monaten eine Therapieresistenz einstellen kann. Erste Arbeiten belegen, dass EVs an der Resistenzentwicklung beteiligt sein können.

Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, den Einfluss von Exosomen auf die Resistenzentwicklung gegen Sunitinib im NZK- in vitro zu untersuchen. Dabei sollen folgende Aufgabenstellungen in der Zelllinie Caki-2 bearbeitet werden:

1. Ermittlung des Effektes von Sunitinib auf die Zellviabilität von Sunitinib-sensiblen und Sunitinib-resistenten Caki-2 Zellen.
2. Isolation und qualitative Analyse von Exosomen von Sunitinib-sensiblen und Sunitinib-resistenten Caki-2 Zellen.
3. Ermittlung des Effektes von Exosomen von Sunitinib-resistenten Caki-2 Zellen auf die Zellviabilität von Caki-2 Wildtyp-Zellen unter Behandlung mit Sunitinib.

4. Material und Methoden

4.1 Material

Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellernamen

Verbrauchsmaterialien und Hersteller	
Combitips advanced® 2,5ml, 5ml	Eppendorf, Hamburg
CELLSTAR® serologische Pipetten 1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
CELLSTAR® Zellkultur-Flaschen 25cm ² , 75cm ² , 175cm ² , 300cm ²	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salz- Lösung	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Falcon® Multiwell™ 12 Well Platte	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Falcon® Multiwell™ 96 Well Platte	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Fetales Kälberserum, steril filtriert	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Luna Cell Counting Slide	Logos Biosystems, South Korea
Nalgene™ Rapid-Flow™ Sterile Einweg- Flaschenaufsatzfilter 0,2µm	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Nunc™ TripleFlask™ Zellkultur-Flasche 500cm ²	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pasteur-Pipetten aus Glas	VWR International, Darmstadt
Pipettenspitzen Eppendorf® -Style 1000µl, 200µl, 10µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen
RPMI-1640-Zellmedium	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Sterilfilter, Porengröße 0,2 µm	Merck Millipore, Darmstadt
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Tubes® 0,5ml, 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Coulter Life Sciences, Brea, USA
Zellkultur-Objektträger, 2-kammrig	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifugenröhrchen 15ml, 50ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Tabelle 9: Verwendete Geräte mit Herstellernamen

Gerätenamen und Hersteller	
Absaughilfe Vacuboy	Integra Biosciences, Fernwald
Absaugsystem Vacusafe	Integra Biosciences, Fernwald
Assay-Reader Infinite F200 pro	Tecan, Crailsheim
Brutschrank Heraeus HeraCell	Kendro Laboratory Products, Hanau
Centrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg
Elektrophoresekammer Mini-Protean 3 Cell	Bio-Rad, Hercules, USA
Intas Chemostar	Intas Science Imaging, Göttingen
Mikroskop Axiovert S100	Carl Zeiss, Jena
Multikanalpipette Transferpette®-8	Eppendorf, Hamburg
Pipetten 1000µl, 200µl, 100µl, 20µl, 10µl	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald
Sicherheitswerkbank Heraeus Herasafe HS12	Kendro Laboratory Products, Hanau
Tischzentrifuge Mini Spin plus	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot® semi-dry Transfer Cell	Bio-Rad, Hercules, USA
Ultrazentrifuge L-80	Beckman Coulter Life Sciences, Brea, USA
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zellzählgerät Luna II	Logos Biosystems, South Korea

Tabelle 10: Verwendete Chemikalien mit Herstellernamen

Chemikalien und Hersteller	
ECL Western Blotting Substrat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Phalloidin-iFluor 488 Konjugat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sunitinib-Malat	Tocris Bioscience, Bristol, GB

Tabelle 11: Verwendete Kits mit Herstellernamen

Kits und Hersteller	
BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PKH26 Linker-Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
WST 1 Cell Proliferation Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % atmosphärisches CO₂ in einem Brutschrank inkubiert. Es wurden Zellkulturflaschen der Größe von 25 cm², 75 cm², 175 cm², 500 cm² verwendet. Die zu untersuchenden Zelllinien Caki-2 als Wildtyp, sowie Caki-2 mit Sunitinibresistenz wurden gleichzeitig kultiviert. Es wurde stets unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank gearbeitet.

Verwendete Zelllinie

Caki-2 ist eine Zelllinie des klarzelligem Nierenzellkarzinoms, welche im Jahre 1975 von einem männlichen, kaukasischen Patienten im Alter von 69 Jahren isoliert wurde. In Kultur zeigen sie eine epitheliale Morphologie und wachsen adhärent am Flaschenboden. Sie weisen eine Mutation im *VHL* - Gen auf, was zum Funktionsverlust des Tumor – Suppressor – Gens führt. Desweiteren exprimieren sie VEGF- Rezeptoren und PDGF- Rezeptoren an ihrer Oberfläche. Die Dopplungszeit betrug für Wildtyp-Zellen ca. 24 Stunden. Für die Sunitinib-resistenten Caki-2 Zellen betrug die Dopplungszeit 36 – 48 Stunden.

Etablierung der Zelllinie

Für die Experimente wurden Caki-2 Zellen verwendet, welche gegen den Tyrosinkinaseinhibitor Sunitinib resistent gemacht wurden. Hierbei wurden Caki-2 Wildtyp-Zellen für 3 Monate (23 Passagen) mit Sunitinib in einer Endkonzentration von 5 µM im Medium behandelt. Der ermittelte IC₅₀-Wert betrug bei einer Zellzahl von 1x10³ Zellen 6 µM Sunitinib. Nach 3-monatiger Behandlung wurden die Zellen nicht mehr chronisch mit Sunitinib behandelt. In der Nachkontrolle der Zellen wurde einmal wöchentlich mithilfe des WST-1 Cell Viability Tests die Zellviabilität unter einer Sunitinibbehandlung von 5 µM im Vergleich zu Caki-2 Wildtyp-Zellen ermittelt.

Inspektion

Für die Inspektion der Zellen wurde das invertierte Mikroskop Axiovert S-100 von Zeiss verwendet. Die Zellen wurden täglich auf Veränderung ihres Wachstums, der Morphologie sowie Verteilung untersucht. Eine regelmäßige Fotodokumentation wurde durchgeführt.

Sunitinib

Sunitinib-malat wurde bei Tocris Bioscience (Bristol, GB) erworben. Sunitinib wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) zu einer 12,5 μM Lösung verdünnt und aliquotiert bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Medienwechsel

Das verwendete Medium war RPMI-1640 mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und wurde alle zwei Tage gewechselt. Bei einer Zellkulturflasche von 25 cm^2 wurden 4,5 ml Medium verwendet. Bei größeren Zellkulturflaschen wie 75 cm^2 und 500 cm^2 wurden 12 ml bzw. 80 ml Medium verwendet. Die Sunitinib-resistenten Zellen wurden alle zwei Tage mit einem Gemisch aus Medium und Sunitinib mit einer Endkonzentration von 3 μM Sunitinib kultiviert.

Passagieren der Zellen

Das Passagieren der Zellen erfolgte bei Wildtyp-Zellen (WT) einmal pro Woche. Bei Sunitinib-resistenten Zellen alle ein bis zwei Wochen. Bei einer Konfluenz der Zellen von über 80% wurde das Medium aus der Zellkulturflasche mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Zellkulturflaschen der Größe von 25 cm^2 wurden mit 2 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gespült und somit lose Zellbestandteile entfernt. (Zellkulturflaschen der Größe 75 cm^2 mit 4 ml PBS, Zellkulturflaschen der Größe 175 cm^2 mit 10 ml PBS). Nach Absaugen des PBS folgte eine Gabe von 1 ml Trypsin/ Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (bei 25 cm^2) und eine 5-minütige Inkubation im Brutschrank. (Zellkulturflaschen der Größe 75 cm^2 mit 2 ml Trypsin/EDTA, Zellkulturflaschen der Größe 175 cm^2 mit 5 ml Trypsin/EDTA). Die Zellen wurden mikroskopisch begutachtet und falls notwendig durch sanftes Schütteln vom Boden der Flasche abgelöst. Das Trypsin/EDTA wurde bei einer Flaschengröße von 25 cm^2 mit 4 ml Medium abgewaschen und die Zellsuspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. (Zellkulturflaschen der Größe 75 cm^2 mit 5 ml Medium, Zellkulturflaschen der Größe 175 cm^2 mit 10 ml Medium). Es folgte eine Zentrifugation von 3 Minuten bei 1100 Umdrehungen pro Minute. Der Überstand des Mediums wurde mithilfe einer Pasteurpipette abgesaugt und das Zellpellet mit 1,5 ml Medium resuspendiert. Je nach gewünschter Verdünnung oder Zellzahl wurde die Zellsuspension in neue Zellkulturflasche überführt. Hierbei wurden Caki-2 WT-Zellen in einem Verhältnis von 1:3 in eine neue Zellkulturflasche der gleichen Größe gesplittet.

Sunitinib-resistente Caki-2 Zellen wurden in einem Verhältnis 1:2 in eine neue Zellkulturflasche der gleichen Größe gesplittet. Bei der Passagierung von Sunitinib-resistenten Caki-2 Zellen in Zellkulturflaschen mit größerer Wachstumsfläche wurden alle Zellen in die neue Flasche überführt. Die Anzahl der Passagen unter Behandlung mit Sunitinib wurde neben der eigentlichen Passagenummer dokumentiert, darum sind in dieser Arbeit Sunitinib-resistente Zellen immer mit zwei Passagenummern gekennzeichnet.

Die Sunitinib-resistenten Zellen wurden 4 Stunden nach der Aussaat in eine neue Zellkulturflasche mit Sunitinib behandelt. Dabei wurden 10 µl des 12,5 µM Sunitinib mit 990 µl RPMI-1640 verdünnt. Dieser Stock 1 hatte eine Sunitinibkonzentration von 125 µM. Folglich wurde die benötigte Menge des Stock 1 mit folgender Formel errechnet. Die gewünschte Endkonzentration von Sunitinib im Medium betrug 3 µM.

$$\text{Volumen Stock 1 } [\mu\text{l}] = \frac{\text{Gesamtvolumen Medium } [\mu\text{l}] \times \text{Endkonzentration Sunitinib } [\mu\text{M}]}{\text{Konzentration Sunitinib in Stock 1 } [\mu\text{M}]}$$

Das errechnete Volumen von Stock 1 wurde daraufhin von dem Gesamtvolumen des Mediums subtrahiert und die errechnete Menge Medium mit der errechneten Menge Stock 1 vermischt und in die Zellkulturflasche gegeben.

Zellzählung

Die Zellen wurden für die Passagierungen, sowie für die Aussaat auf Platten gezählt. Nach der Ablösung von der Zellkulturflasche durch Trypsin/EDTA und der Zentrifugation wurden das Zellpellet in 3 ml Medium resuspendiert. 10 µl Zellsuspension wurden mit 10 µl Trypanblau in einem Eppendorf Tube vermischt. Mithilfe des anionischen Bisazofarbstoffes Trypanblau lassen sich lebendige Zellen von toten Zellen unterscheiden. Lebendige Zellen mit intakter Zellmembran nehmen den Farbstoff nicht auf, da das anionische Farbstoffmolekül nicht in der Lage ist durch die hydrophobe Zellmembran zu diffundieren, wohingegen tote Zellen eine erhöhte Permeabilität ihrer Membran aufweisen und somit der Farbstoff die Zelle blau färbt. Davon wurden 10 µl in einen Luna Cell Counting Slide aufgetragen und vom Zellzählgerät Luna II ausgezählt. Das benötigte Volumen an Zellsuspension für die geplanten Experimente wurde nach folgender Formel errechnet.

$$\text{Benötigte Zellsuspension } [\mu\text{l}] = \frac{\text{gewünschte Zellzahl} \times \text{Gesamtsuspension } [\mu\text{l}]}{\text{Gesamtzellzahl}}$$

Vorbereitung der 96 Well Platte für Tests

Die 96 Well Platte wurde in allen äußeren Wells mit 100 µl PBS befüllt, um der, durch die Inkubation bedingte, Verdunstung von Medium vorzubeugen. Die für Tests verwendeten Wells wurden mit 100 µl Medium pipettiert. Die Zellen wurden abtrypsiniert (siehe Passagierung) und in 3 ml Medium resuspendiert. Darauf folgte eine Zellzählung (siehe Zellzählung). Die für den Test benötigte Zellzahl ergibt sich aus der Anzahl der gewünschten Zellen pro Well und der Anzahl der für den Test verwendeten Wells. Somit kann man mit der benötigten Zellzahl und der gezählten Zellzahl in 3 ml Medium, die Menge der benötigten Zellsuspension in Mikroliter errechnen. Die gewünschte Zellzahl wurde dann in 100 µl pro Well ausgesät. Die 96 Well Platte wurde im Brutschrank gelagert. Für den WST-1 Assay wurde eine Zellzahl von 2000 Zellen in einem Volumen von 100 µl pro Well verwendet.

4.2.2 WST-1 Cell Viability Assay

Der WST-1 Assay dient der spektrophotometrischen Quantifizierung der Zellproliferation und Viabilität von ausgesäten Zellen auf einer 96 Well Platte. Das Cell Proliferation Reagenz WST-1 (water soluble Tetrazolium) besteht aus Tetrazoliumsalzen, welche durch die mitochondriale NAD-abhängige Dehydrogenase in Zellen zu Formazan umgewandelt werden. Tetrazoliumsalze und Formazan haben unterschiedliche Farben. Tetrazolium erscheint in der Reagenzlösung dunkelrot, wohingegen Formazan eine orangene Farbe aufweist. Der Farbumschlag von dunkelrot auf orange ist bei Zellen mit einer höheren Enzymaktivität intensiver und wird photometrisch durch den Tecan Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm quantifiziert.

Das Cell Proliferation Reagenz WST-1 wurde in einem Verhältnis von 1:10 mit Zellmedium vermischt. Das Medium in den Wells wurde vorsichtig ausgeklopft, damit nur noch Zellen in den Versuchswells vorhanden waren. Auf diese Zellen wurde 100 µl pro Well der Mischung von WST-1 Reagenz und Medium pipettiert. Außerdem wurden drei Wells ohne Zellen nur mit 100 µl der Mischung befüllt. Diese dienten der Messung der Absorption des Zellmediums selbst, welche in der Auswertung von den Absorptionswerten der Versuchswells mit Zellen abgezogen wurde. Die 96 Well Platte wurde für 90 Minuten bei 37 °C und 5 % atmosphärischen CO₂ inkubiert. Nach 60 und 90 Minuten wurde je eine photometrische Messung mit dem Tecan Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel. Dabei wurden die Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte ermittelt und

in Verhältnis zu der Kontrollgruppe in Prozent dargestellt. Der resultierende Wert entsprach dem Prozentsatz der Zellviabilität der Zellen relativ zur Kontrollgruppe.

4.2.3 Isolation von Exosomen mittels Ultrazentrifugation

Um zu gewährleisten, dass nur die Exosomen der Versuchszellen isoliert werden, wurden die Zellmedien 72 Stunden vor der Isolation auf exosomenfreies Medium gewechselt. Die Zellkulturflaschen der Größe von 500 cm² wurden hierfür nach Entfernen des Altmediums dreimal mit jeweils 30 ml PBS ausgespült und danach mit 80 ml exosomenfreiem Medium pro Flasche befüllt. Nach 72 Stunden wurde das Zellmedium aller Zellkulturflaschen steril filtriert und in 50 ml Falcons abgeschüttet. Die Falcons wurden für 20 Minuten bei 2.000 G und anschließend für 30 Minuten bei 15.000 G zentrifugiert. Der Überstand der Falcons wurden in die Zentrifugenröhrchen der Ultrazentrifuge überführt und mit PBS auf genau 56,0 g aufgefüllt. Diese wurden für eineinhalb Stunden bei 40.000 Umdrehungen pro Minute bei 4 °C im Vakuum ultrazentrifugiert. Danach wurde der Überstand des Mediums jeder Flasche verworfen und die Pellets jeweils mit 1 ml PBS 30-mal resuspendiert und zusammen in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben. Dieses wurde auf 56.0 g mit PBS aufgefüllt und erneut bei 40.000 Umdrehungen pro Minute für eineinhalb Stunden ultrazentrifugiert. Dieser Schritt dient der Purifikation der erhaltenen Exosomen. Der Überstand der Probe wurde verworfen und das erhaltene Pellet mit 100 µl PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf Tube pipettiert. Die Exosomen wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Herstellung von exosomenfreien fetalen Kälberserum

Das Fetale Kälberserum (FCS) wurde in 8 Ultrazentrifugenröhrchen aufgeteilt und auf 56.0 g pro Röhrchen austariert. Es folgte eine Ultrazentrifugation bei 4°C und 50.000 rpm für 18 bis 20 Stunden. Danach wurde der Überstand der Röhrchen in 50 ml Falcons überführt und unter einer sterilen Werkbank mit einem Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,2 µM filtriert. Das Filtrat wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Das exosomenfreie FCS wurde für die Verwendung in der Zellkultur mit RPMI-1640 in einem Verhältnis von 1:10 gemischt.

BCA-Protein Assay

Der BCA-Protein Assay dient der Quantifikation der totalen Proteinmenge einer Probe. Dieser Assay basiert auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu¹⁺ durch Proteine in alkalischer Lösung. Die Aminosäuren Cystein, Cystin, Tyrosin und Tryptophan bilden einen Komplex mit Cu²⁺-Ionen, welche dann durch das alkalische Milieu zu Cu¹⁺-Ionen reduziert werden. Das Reagenz BCA (bicinchoninic acid) bildet mit den entstandenen einwertigen Kupferionen einen violetten

Komplex, welchen man photometrisch detektieren kann. Dabei bilden zwei Moleküle BCA einen Chelatkomplex mit einem zentral stehenden Cu^{1+} -Ion. Um aus den erhaltenen Messwerten eine Proteinkonzentration errechnen zu können, fertigt man eine Standardkurve aus Absorptionswerten von bovinem Serumalbumin (BSA) an. Dabei werden neun Proben mit sich halbierenden BSA Konzentrationen erstellt. Beginnend mit unverdünntem BSA in einer Konzentration von 2000 $\mu\text{g/ml}$ wird das BSA in den weiteren Proben immer um die Hälfte mit PBS verdünnt, bis nur noch eine Konzentration von 32,5 $\mu\text{g/ml}$ BSA vorliegt. Die letzte Probe ist reines PBS ohne BSA. Die zu analysierende Exosomenprobe wurde 1:5 mit PBS verdünnt und danach mit der vorher erstellten Standardreihe in Duplikaten auf eine 96 Well Platte übertragen. Dabei wurden jeweils 10 μl pro Well pipettiert. Das BCA Reagenz A wurde im Verhältnis 50:1 mit dem BCA Reagenz B vermischt und jeweils 200 μl pro Well auf die Proben gegeben. Die 96 Well Platte wurde 30 Sekunden geschüttelt und danach für 30 Minuten inkubiert. Die Absorption wurde mit dem Tecan Reader bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. In Microsoft Excel wurden die Absorptionswerte der BSA Proben in einem Koordinatensystem gegen die Proteinkonzentration aufgetragen und eine Funktion aus der resultierenden Standardkurve ermittelt. Diese Funktion wurde genutzt, um die Konzentration der Proteinmenge in der Exosomenprobe mithilfe der Absorptionswerte zu errechnen.

4.2.4 Stimulation von Caki-2 Zellen mit Exosomen

Um eine mögliche Wirkung der isolierten Exosomen von Wildtyp-Zellen und Sunitinib-resistenten Zellen auf die Zellviabilität von Caki-2 Wildtyp-Zellen unter Sunitinibbehandlung festzustellen, wurden Caki-2 Wildtyp-Zellen in eine 12 Well Platte ausgesät und insgesamt 3-mal mit Exosomen stimuliert. Der Versuch wurde insgesamt 2-mal durchgeführt. Beim ersten Mal wurden Zellen und Exosomen der Passage 68 verwendet, beim zweiten Mal Zellen und Exosomen der Passage 71.

Die Zellen wurden nach Protokoll aus der Zellkulturflasche abtrypsiniert und gezählt (siehe Passagierung, Zellzählung). Dabei erfolgten die Schritte mit exosomenfreiem Medium, um den Gehalt an Exosomen im Medium selbst zu minimieren. Dem Medium wurden in einem Verhältnis von 1 % mit Penicillin/Streptomycin versetzt, um Kontaminationen vorzubeugen. Die Zellen wurden dann in einer Zellzahl von $2,5 \times 10^4$ Zellen pro Well in einem Volumen von 1 ml Medium nach dem Schema in Abbildung 3 in eine 12 Well Platte ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Bei der ersten Exosomenstimulation wurde jedem Well 500 μl Medium entnommen und die Exosomen bzw. PBS mit frischem exosomenfreiem Medium vermischt und in einem Volumen von wiederum 500 μl pro Well pipettiert. Dabei betrug die Endkonzentration für

Exosomen von Wildtyp-Zellen und Exosomen von Sunitinib-resistenten Zellen pro Well jeweils 8 bzw. 20 µg/ml. Nach erneuter Inkubation von 24 Stunden erfolgte die zweite Exosomenstimulation. Dabei wurde nur die Menge des Zellmediums aus den Wells entfernt, welche man später in Form von Exosomen wieder hinzugegeben hat. Die Exosomenkonzentration betrug hierbei wieder 8 bzw. 20 µg/ml für beide Exosomentypen.

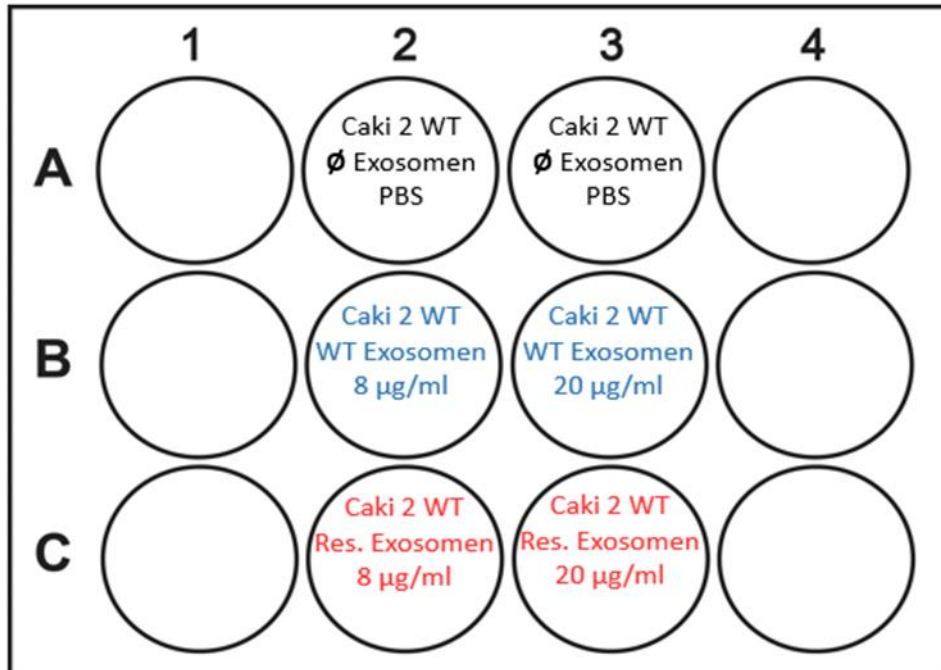


Abbildung 3: 12 Well Plattenschema mit Versuchsaufbau und Exosomenkonzentrationen. **A:** Caki-2 Wildtyp (WT) ohne Exosomen, nur Phosphate Buffered Saline (PBS); **B:** Caki-2 Wildtyp (WT) mit Wildtyp Exosomen in 8µg/ml und 20µg/ml; **C:** Caki-2 Wildtyp (WT) mit Exosomen von Sunitinib-resistenten Zellen in 8µg/ml und 20µg/ml

Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen nach Protokoll auf eine 96 Well Platte übertragen (siehe Vorbereitung der 96 Well Platte). Dabei wurde das Zellmedium aus den Wells entfernt und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Das Abtrypsinieren der Zellen erfolgte mit 200 µl Trypsin/EDTA pro Well bei einer Inkubation von 5 Minuten. Nach der Zellzählung wurden die Zellen mit einer Zellzahl von 2×10^3 Zellen pro Well in einem Endvolumen von 100 µl nach dem Schema in Abbildung 4 ausgesät. Außerdem wurden Sunitinib-resistente Caki-2 Zellen der Passage 68/37 bzw. 71/40 in der gleichen Zellzahl auf der Platte ausgesät. Sie dienten in der Messung als Positiv-Kontrolle. Die unterschiedlich behandelten Zellen wurden jeweils in 2 Triplets von Wells ausgesät. Nach der Aussaat wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. In dieser Zeit konnten sich die ausgesäten Zellen am Boden der Wells absetzen. Die 3. Exosomenstimulation erfolgte dann 30 Minuten nach der Aussaat der Zellen auf der 96 Well Platte. Dabei wurde, wie bei der 2. Exosomenstimulation, nur das Volumen von Zellmedium entfernt, welches man danach in Form von Exosomen

wieder in das Well gegeben hat. Die Exosomenkonzentration betrug erneut 8 bzw. 20 µg/ml. Nach 24 Stunden Inkubation wurde jeweils ein Tripletts von Wells mit einer Konzentration von 3 µM Sunitinib in einem Endvolumen von 200 µl pro Well behandelt. Hierbei wurde aus jedem Well 100 µl Medium verworfen und mit 100 µl einer 6 µM Sunitiniblösung aufgefüllt. Die restlichen Tripletts dienen als Kontrollgruppe und wurden nur mit Frischmedium und DMSO in einem Endvolumen von 200 µl pro Well versetzt. Nach 72 Stunden Inkubation wurde die Zellviabilität der Zellen mittels WST-1 Assay bestimmt (siehe WST-1 Assay).

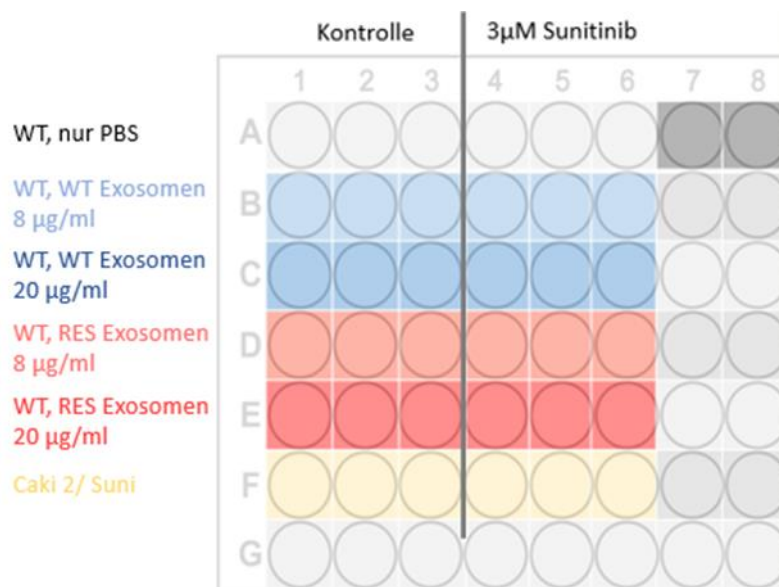


Abbildung 4: Ausschnitt eines 96 Well Plattenschemas mit Versuchsaufbau und Exosomenkonzentrationen. **A:** Caki-2 Wildtyp (WT) ohne Exosomen, nur Phosphate Buffered Saline (PBS); **B/C:** Caki-2 Wildtyp (WT) mit Wildtyp Exosomen in 8µg/ml und 20µg/ml; **D/E:** Caki-2 Wildtyp (WT) mit Exosomen von Sunitinib-resistenten Zellen (RES) in 8µg/ml und 20µg/ml; **F:** Caki-2 Sunitinib-resistente Zellen (Sun) ohne Exosomen bzw. PBS

4.2.5 Exosomencharakterisierung

Vorbereitung der Exosomenprobe

Um die Exosomenstruktur zu lösen, wurde das erhaltene Exosomenpellet nach der Ultrazentrifugation nicht in PBS, sondern in 50 µl Lysepuffer resuspendiert und bis zur Analyse in - 80°C eingefroren. Tryton X-100, ein nichtionisches Tensid, ist die aktive Substanz des Lysepuffers und wirkt, indem es die Exosomenmembran dissoziiert. Dadurch werden intraexosomale Proteine freigesetzt. Der Lysepuffer wurde vor der Verwendung mit Proteinaseinhibitoren und Phosphataseinhibitoren vermischt. Diese verhindern den Abbau von Proteinstrukturen durch proteolytische Enzyme in der Probe. Hierbei wurden 480 µl Lysepuffer mit jeweils 60 µl Protease- und Phosphataseinhibitoren versetzt. Die Proteinmenge der Probe

wurde mittels BCA-Protein Assay quantifiziert (siehe BCA-Protein Assay). Die Probe wurde anschließend mit Lämmli Puffer vermischt. Lämmli Puffer besteht aus Natrium Dodecyl Sulfat (SDS), Beta-Mercaptoethanol, Glycerol, Tris (pH 6,8) und Bromphenolblau. Durch die Bindung von mehreren SDS-Molekülen an die hydrophoben Strukturen der Proteine wird die Proteinstruktur im Überschuss negativ geladen, was die ionischen Wechselwirkungen zwischen Proteinketten aufhebt und das Protein linearisiert. Diese Linearisierung ermöglicht die Auftrennung der Proteine nach der Molekülmasse mittels Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE). Glycerol dient, durch seine Viskosität und größere Dichte, als Gewicht beim Beladen des PAGE, um die Probe in der Ladekammer des PAGE zu komprimieren. Beta-Mercaptoethanol löst vorhandene Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten. Tris ist ein pH-Puffer Agenz, das den Lämmli-puffer in einem neutralen pH-Bereich puffert, während der Farbstoff Bromphenolblau die Position der Probe auf dem PAGE visualisiert. Das Lysat wurde für 5 Minuten auf 95 °C in einem Thermoblock erhitzt, kurz in flüssigen Stickstoff abgekühlt und bei - 80 °C gelagert. Bei Verwendung der Proben für die PAGE wurden diese für 1 Minute im Thermoblock auf 95 °C erhitzt, um das gefrorene SDS zu schmelzen, und anschließend aliquotiert.

Tabelle 12: Verwendete Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Lämmli Puffer (2X)	20 % Glycerol 10 % beta-Merceptoethanol 4 % SDS 0,1 % Tris (pH 6,8) 0,005 % Bromphenol-Blau
Wasch Puffer (1L, 10X)	80 g NaCl 30 g Tris Buffered Saline 10 ml Tween20 pH 7,6 dH ₂ O
Lauf Puffer (1L,10X)	144 g Glycin 30.27 g Tris 10 g SDS pH 8.3 dH ₂ O
Blotting Puffer (1L,1X)	48 mM Tris Bufferd Saline 39 mM Glycin 15 % Methanol 0,01 % SDS dH ₂ O
Stripping Puffer (100ml)	1,5 g Glycin 0,1 g SDS 1 ml Tween20 pH 2,2 mit HCl dH ₂ O
Bovines Serum Albumin (100ml, 5%)	5 g BSA 100 ml TBsT
Nonfat Dry Milk (100ml, 5%)	5 g Milchpulver 100 ml TBsT

Die SDS-Page Gelelektrophorese und das Western Blot Verfahren wurden als Nachweis exosomaler Markerproteine in den isolierten Proben angewandt. Die durch das SDS negativ geladenen, linearisierten Proteine werden durch Anlegen einer Spannung in einem Polyacryl-Gel nach ihrem molekularen Gewicht aufgetrennt. Für den SDS-Page wurde ein Gradienten-Gel (8 %-16 %) verwendet, welches in der Kammer mit ca. 600 ml Lauf Puffer umspült wurde. Da das Gradienten-Gel eine nach unten zunehmenden Polymerisationsgrad aufweist, können im Vergleich zu Gelen mit einheitlichen Polymerationsgrad kleine Proteine besser aufgetrennt und dargestellt werden. Die Proben wurden in zwei unterschiedlichen Konzentrationen in die Wells des Gels pipettiert. Dabei wurde Exosomenlysat von Wildtyp-Zellen und Sunitinib-

resistenten Zellen in den Konzentrationen 10 µg pro Well und 6 µg pro Well pipettiert. Als Protein Marker wurde der PageRular Prestained Protein Marker von Thermo Scientific verwendet. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 70 V und 50 mA für 30 Minuten durchgeführt. Anschließend wurde die Spannung für die folgenden 2 Stunden auf 120 V erhöht. Währenddessen wurde eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) für das Blotting Verfahren auf die Größe des verwendeten Gels zugeschnitten und für eine Minute in Methanol (100%) aktiviert. Nach gründlichem Abspülen mit Aqua dest. erfolgte die Inkubation in Transfer Puffer. Der SDS-Page wurde beendet, als die unterste Bandenmarkierung von 10 kDa den unteren Rand des Gels erreichte.

Das Blotting-Verfahren dient der Übertragung der im Gel aufgetrennten Proteinbanden auf die PVDF-Membran mittels Anlegens einer Spannung. Im semi-dry Verfahren wird das Gel der Elektrophorese mit in Transfer Puffer getränkten Filterpapieren und der aktivierten PVDF-Membran gestapelt. Der Transfer Puffer enthält wiederum SDS, wodurch die negativ geladenen Proteine entlang des angelegten Spannungsgradienten auf die PVDF-Membran wandern. Die Filterpapiere wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten und in Transfer Puffer angefeuchtet. Beim Stapeln der feuchten Papiere und des Gels wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen zwischen den Schichten bestehen bleiben, da diese den Proteintransfer über den Transfer Puffer erschweren. Für 1 Stunde wurde es bei 120 mA, 25 V und 50 W in der Semi-dry Transfer Cell inkubiert. Nach dem Blotting wurde die PVDF-Membran 10 Minuten in Tris-buffered Saline with Tween20 Puffer (TBsT) eingelegt. Danach folgte das Blockieren der Membran in 5 % Milchlösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Dies verhindert die unspezifische Bindung der verwendeten Antikörper an Proteine auf der Membran.

Antikörper-Inkubation und Detektion

Für den Nachweis von exosomalen Markerproteinen auf der PVDF-Membran wurden Antigen spezifische Primärantikörper verwendet, welche mit unspezifischen Sekundärantikörpern markiert wurden. An diesen Sekundärantikörpern befinden sich wiederum das Enzym Meerrettich-Peroxidase, welches bei Umsetzung des Substrates Luminol einen chemolumineszierenden Stoff katalysiert. Die Detektion und Bildgebung erfolgte mit INTAS Chemostar. Tabelle 13 zeigt die verwendeten Antikörper.

Tabelle 13: Primärantikörper mit Zielantigenen, Verdünnung, Größe (kDa) und Herkunft

Antigen	Verdünnung	Größe (kDa)	Herkunft
CD9	1:1000 in BSA 5%	22 – 30	Kaninchen
CD63	1:1000 in Milch 5%	25 – 65	Kaninchen
Syntenin	1:1000 in BSA 5%	32	Kaninchen
c-MET	1:1000 in BSA 5%	135	Maus
GAPDH	1:1000 in Milch 5%	37	Kaninchen
GM130	1:1000 in BSA 5%	130 - 135	Kaninchen

Die Primärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:1000 in BSA oder Milch auf die Membran gegeben. Dabei wurden 4,5 µl Primärantikörper mit 4,5 ml BSA oder Milch vermischt und unter Bewegung bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach ca. 12 Stunden Inkubation wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in TBsT (1 X Konzentration) gewaschen. Anschließend folgte eine zweistündige Inkubation mit einem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur. Sie wurden bei Cell Signaling Technology (Danvers, USA) erworben. Die Sekundärantikörper richten sich gegen die F_c-Region der Primärantikörper und lassen sich somit in Anti-Kaninchen und Anti-Maus einteilen. Diese wurden in einem Verhältnis von 1:2000 in BSA oder Milch verdünnt und auf die Membran gegeben. Nach der Inkubation erfolgte eine erneute Waschung mit TBsT. Für die Detektion der markierten Proteine wurde das Pierce ECL Western Blotting Substrat verwendet. Die sekundären Antikörper sind mit dem Enzym namens Meerrettich-Peroxidase konjugiert. Die ECL Lösung enthält Luminol, welches durch die Meerrettich-Peroxidase reduziert wird. Das katalysierte Luminol emittiert Photonen. Diese Chemolumineszenz ist Grundlage der Detektion der markierten Proteinbanden. Die ECL-Lösung A wurde mit ECL-Lösung B in einem Verhältnis von 1:40 vermischt und anschließend auf die Membran gegeben. Das Gerät INTAS belichtete die Membran für 5 Minuten mit einer Bildfrequenz von 15/s.

Um die gleiche Membran mit mehreren Antikörpern (AK) färben zu können, wurde vor der Inkubation mit neuen Primärantikörpern ein Stripping Puffer verwendet, um die vorherigen AK abzulösen. Dabei wurde die Membran bei Raumtemperatur zweimal für 15 Minuten mit Stripping Puffer inkubiert. Danach wurde dieser verworfen und die Membran mit PBS abgespült. Darauf folgte eine Waschung mit TBsT für 10 Minuten. Die Membran wurde dann mit Milch oder BSA mit jeweils 0,05 % Natrium-Azid für eine Stunde inkubiert. Natrium-Azid degradiert die Meerrettich-Peroxidase an den sekundären AK und vermindert somit eine erneute Detektion bei weiteren Messungen. Nach einer Waschung mit TBsT konnte danach erneut mit Primärantikörpern inkubiert werden.

Fluoreszenzmarkierung von Exosomen

Um die zelluläre Aufnahme von isolierten Exosomen nachzuweisen, wurden diese mithilfe von PKH-26 angefärbt und unter einem Laserscanner analysiert. PKH-26 ist ein lipophiler, rot fluoreszierender Farbstoff, welcher zur Darstellung von Membranen verwendet wird. Caki-2 Wildtyp-Zellen wurden ein Tag vor der Färbung der Exosomen in zwei Zellkultur-Objektträger mit jeweils 2 Kammern ausgesät. Hierbei wurde RPMI mit 10 % exosomenfreien FCS, sowie 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet. Die ausgesäte Zellzahl betrug $3,5 \times 10^4$ Zellen pro Kammer in einem Volumen von 2 ml Zellmedium. Es folgte eine Inkubationszeit von 24 Stunden.

Die Probe isolierter Exosomen wurde auf Eis aufgetaut und in ein 1,5 ml Tube überführt. Gleichzeitig wurde ein weiteres Tube mit 100 µl PBS vorbereitet. Diese Probe diente als Kontrolle. Die Exosomenlösung, sowie das PBS wurde danach mit 500 µl Diluent-C vermischt und lichtgeschützt auf Eis gelagert. In zwei weiteren Tubes wurde jeweils 500 µl Diluent-C mit 2 µl des Farbstoffs PKH-26 vermischt. Diese Lösungen wurden 5 Minuten lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Nach 5 Minuten Inkubation wurde die Exosomenlösung und das PBS in die Tubes mit PKH-26 überführt und erneut 5 Minuten auf Eis inkubiert. Hierbei wurde die Lösung regelmäßig resuspendiert. Die Färbung wurde anschließend mit 1 ml exosomenfreien FCS pro Tube gestoppt. Der nicht gebundene Farbstoff in den Proben wurde durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 3.000 G und 4 °C aus den Proben entfernt. Hierbei wurden die Proben in Pierce Protein Concentrator 100K Tubes pipettiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und die Proteinkonzentration mittels des BCA-Protein Assays quantifiziert (siehe BCA-Protein Assay).

Die ausgesäten Zellen auf den Zellkultur Objektträgern wurden nun mit der gefärbten Exosomenlösung bzw. der Kontrolle (PBS) beimpft. Hierbei wurden zwei Kammern mit der Exosomenkonzentration von 20 µg/ml bzw. 40 µg/ml behandelt. Die restlichen zwei Kammern erhielten die Kontrolllösung. Die Kammern wurden über Nacht inkubiert.

Um das Zytoskelett der inkubierten Zellen darzustellen, wurde der Phalloidin-iFluor 488 Konjugat verwendet. Phalloidin-iFluor 488 Konjugat bindet an F-Actin im Zytoskelett und macht es über grüne Fluoreszenz im Mikroskop sichtbar. Die Färbung lief nach folgendem Schema ab (Tabelle 14).

Tabelle 14: Protokoll der Zytoskelettfärbung mit Phalloidin-iFluor 488 Konjugat

1. Zellmedium entfernen		
2. Waschen		
Kaltes PBS (+Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	3-mal	kurz
3. Fixierung		
Kaltes PFA 4 % in PBS	500 µl/Kammer	30 Minuten
4. Waschen		
Kaltes PBS	3-mal	kurz
5. Permeabilisation		
PBS 0,1 % Triton X	600 µl/Kammer	10 Minuten
6. Waschen		
Kaltes PBS	3-mal	kurz
7. Blockieren		
3 % BSA in PBST	600 µl/Kammer	45 Minuten
8. Immunostaining		
Phalloidin-iFluor 488 Konjugat	250 µl/Kammer	60 Minuten
9. Waschen		
Kaltes PBS	3-mal	5 Minuten

Das Zellmedium wurde hierbei aus den Kammersystemen entfernt und die Zellen wurden drei Mal mit PBS (+Ca²⁺, Mg²⁺) gespült. Danach wurden die Zellen mit Paraformaldehyd (PFA) 4 % in PBS fixiert. Hierbei wurde 500 µl PFA 4 % in PBS pro Kammer verwendet. Nach 30 Minuten Inkubation wurde das PFA verworfen und die Kammern mit PBS ausgespült. Für 10 Minuten wurde PBS mit 0,1 % Triton X mit den Zellen inkubiert. Triton X macht Zellmembranen permeabel und ermöglicht somit ein besseres Färben. Nach erneutem Auswaschen mit PBS erfolgte das Blockieren mit 3 % BSA in PBST mit 0,1 % Triton X für 45 Minuten. Die Blocking-Lösung wurde aus den Kammern entfernt und das Phalloidin-iFluor 488 Konjugat wurde in einer Verdünnung von 1:1000 auf die Zellen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten erfolgte eine erneute Waschung mit PBS. Die Kammern wurden anschließend mithilfe eines Skalpell vorsichtig vom Glas entfernt. Danach wurden die Präparate mit Mounting Medium eingedeckt. Dieses Medium enthält DAPI, ein Farbstoff, welcher DNA und somit die Zellkerne der Zellen markiert. Es folgte die Abdeckung durch ein Deckglas und die Lagerung im Dunkeln bei - 20 °C. Die Bildgebung erfolgte mittels Laserscanner.

5. Ergebnisse

5.1 Ermittlung des Effektes von Sunitinib auf die Zellviabilität

Für den Versuch wurden Caki-2 Zellen verwendet, welche durch unsere Arbeitsgruppe in einer vorherigen Studie chronisch mit 5 μM Sunitinib behandelt wurden und somit eine Resistenz gegenüber Sunitinib entwickelt haben. Die Kultivierung der Versuchszellen erfolgte unter Gabe von 5 μM Sunitinib im Zellmedium. Mithilfe des WST-1 Assays wurde die Zellviabilität der Sunitinib-resistenten Caki-2 Zellen bei einer Sunitinibkonzentration von 5 μM ermittelt. Aufgrund einer Kontamination einer Zellkulturflasche sind in diesem Experiment nur zwei, anstatt drei Bioreplikate der Sunitinib-resistenten Zellen getestet worden. Die restlichen Experimente wurden immer in Triplikaten von Wildtyp und Sunitinib-resistenten Zellen durchgeführt.

Die Wildtyp-Zellen weisen unter einer Behandlung von 5 μM Sunitinib eine Zellviabilität von 43,2 % bis 48,2 % auf. Die Sunitinib-resistenten Zellen hatten eine Zellviabilität von 31,6 % und 47,7 % (siehe Abb. 5). Sie hatten somit keine höhere Zellviabilität unter einer Sunitinibgabe von 5 μM als Caki-2 Wildtyp-Zellen. Es konnte bei diesen Zellen somit nicht von einer Sunitinib Resistenz ausgegangen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Test wiederholt.

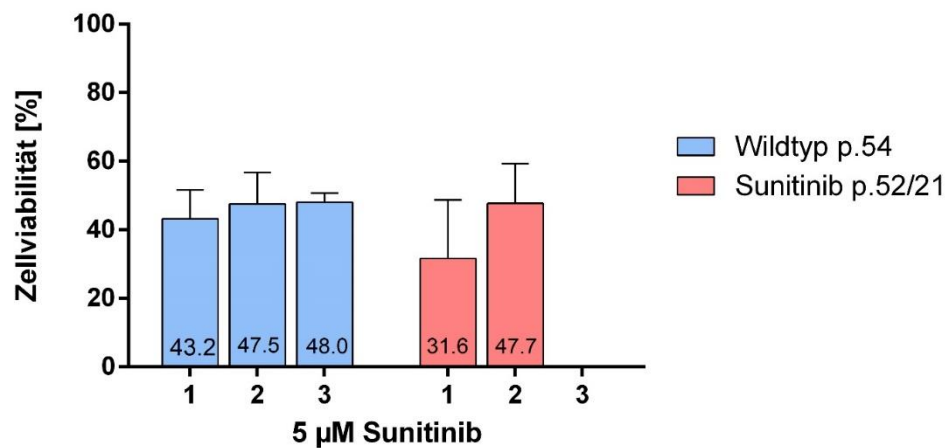


Abbildung 5: Zellviabilitäten von Caki-2 Wildtyp-Zellen der Passage 54 (p.54; blau) und Sunitinib-behandelte Zellen der Passage 52 (p.52/21; rot) unter Behandlung mit 5 μM Sunitinib. Die Zellviabilität der Negativkontrolle wurde auf 100 % gesetzt und die Zellviabilitäten der behandelten Zellen darauf normalisiert. Die Nummerierung der X-Achse entsprechen den biologischen Replikaten desselben Experiments. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der technischen Replikate an.

In der Wiederholung wurden Caki-2 Wildtyp-Zellen der Passage 60 verwendet. Unter einer Behandlung von 5 μM Sunitinib wies der Caki-2 Wildtyp eine Zellviabilität von 27,5 % bis 36,8 % auf. Die Sunitinib-resistenten Caki-2 Zellen hatten eine Zellviabilität von 27,0 % bis 60,8 % (siehe Abb. 6).

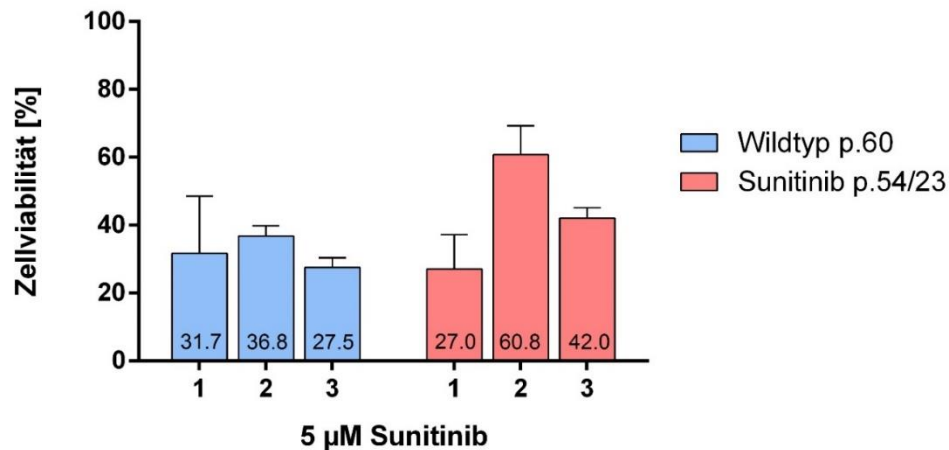


Abbildung 6: Zellviabilitäten von Caki-2 Wildtyp-Zellen der Passage 60 (p.60; blau) und Sunitinib-behandelte Zellen der Passage 54 (p.54/23; rot) unter Behandlung mit 5 μM Sunitinib. Die Zellviabilität der Negativkontrolle wurde auf 100 % gesetzt und die Zellviabilitäten der behandelten Zellen darauf normalisiert. Die Nummerierung der X-Achse entsprechen den biologischen Replikaten desselben Experiments. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der technischen Replikate an.

Auf die chronische Behandlung mit 5 μM Sunitinib reagierten die Sunitinib resistenten Caki-2 Zellen mit einer starken Beeinträchtigung der Zellproliferation und vermehrten Zelluntergang. Deshalb wurde die Sunitinibkonzentration für die chronische Behandlung der Zellen von 5 μM Sunitinib auf 3 μM Sunitinib gesenkt. Dieser Wert entspricht der ermittelten IC40 Konzentration. Des Weiteren wurden die nachfolgenden WST-1 Cell Viability Assays mit 3 μM und 5 μM im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolllinie durchgeführt.

Unter der Behandlung mit 3 μM Sunitinib hatten Caki-2 Wildtyp-Zellen eine durchschnittliche Zellviabilität von 65,5 %. Die Sunitinib-resistenten Zellen wiesen hingegen eine durchschnittliche Zellviabilität von 73,6 % auf. Die Zellviabilität des Wildtyps unter der Behandlung mit 5 μM Sunitinib lag bei 39,7 %, die der Sunitinib-resistenten Zellen bei durchschnittlich 44,4 % im Vergleich zu den Kontrollzellen (siehe Abb. 7). Aufgrund der signifikant erhöhten Zellviabilität der chronisch behandelten Zellen ($p=0,0006$) unter einer Behandlung mit 3 μM Sunitinib im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen wurde von einer erhöhten Toleranz gegenüber Sunitinib ausgegangen.

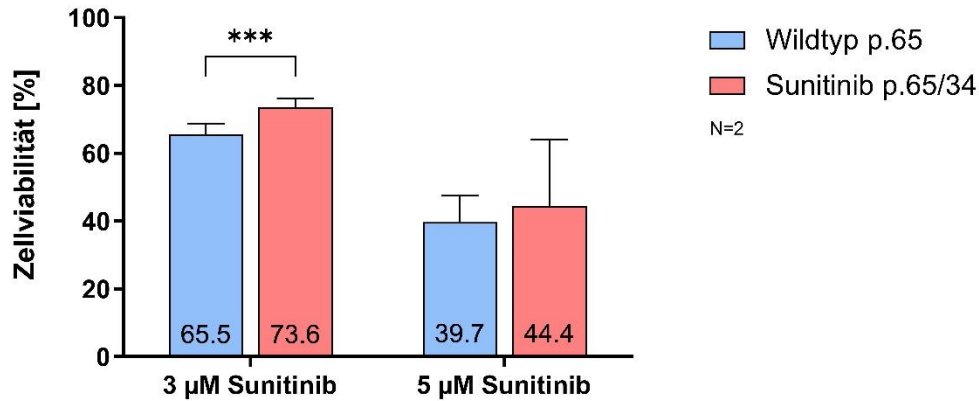


Abbildung 7: Zellviabilitäten von Caki-2 Wildtyp-Zellen der Passage 65 (p.65; blau) und Sunitinib-behandelten Zellen der Passage 65 (p.65/34; rot) unter Behandlung mit 3 bzw. 5 µM Sunitinib. Die Zellviabilität der Negativkontrolle wurde auf 100 % gesetzt und die Zellviabilitäten der behandelten Zellen darauf normalisiert. Die Balken zeigen die durchschnittliche Zellviabilität der biologischen Replikate aus zwei unabhängigen Versuchen (N=2). Die Fehlerbalken geben die durchschnittliche Standardabweichung an. (***: p-Wert < 0,001).

5.2 Isolation von Exosomen mittels Ultrazentrifugation

Nach Bestimmung der Zellviabilität der Versuchszellen durch den WST-1 Cell Viability Test wurden diese in 500 cm² Triple Flasks kultiviert. Die Sunitinib-resistenten Zellen wurden weiterhin mit 3 µM Sunitinib behandelt. Insgesamt wurden sieben Ultrazentrifugationen von Caki-2 Wildtyp-Zellen und Caki-2 Sunitinib-resistenten Zellen durchgeführt. Dabei wurden Exosomenkonzentrationen zwischen 0,506 µg/µl und 0,156 µg/µl isoliert (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Durchgeführte Ultrazentrifugationen unter Angabe der Zellart, Passage, verwendete Zellkulturflaschen und Exosomenkonzentration. (Suni: Sunitinib-resistente Zellen)

	Name, Passage	Flaschengröße	Exosomenkonzentration
1	Caki-2 Wildtyp p. 65	6 x 300 cm ²	0,256 µg/µl
2	Caki-2 Wildtyp p. 68	4 x 500 cm ²	0,182 µg/µl
3	Caki-2 Suni p. 68/37	4 x 500 cm ²	0,506 µg/µl
4	Caki-2 Wildtyp p. 71	4 x 500 cm ²	0,200 µg/µl
5	Caki-2 Suni p. 71/40	4 x 500 cm ²	0,156 µg/µl
6	Caki-2 Wildtyp p. 73	3 x 500 cm ²	Lysiert
7	Caki-2 Suni p. 73/42	3 x 500 cm ²	Lysiert

Die isolierten Exosomen wurden verwendet, um qualitative und quantitative Analysen wie Western Blot, Nanotracking Analysis und eine Fluoreszenzmarkierung durchzuführen. Außerdem wurden sie für die Exosomenstimulation der Caki-2 Wildtyp-Zellen benutzt.

5.3 Exosomencharakterisierung

5.3.1 Nanotracking Analyse

Nach der Isolation von Exosomen wurde mithilfe der Nanotracking Analyse die Größe und Konzentration der gewonnenen Exosomenpartikel von Caki-2 Wildtyp-Zellen und Caki-2 Sunitinib-resistenten Zellen bestimmt. Die Durchschnittsgröße der Partikel des Wildtyps betrug 95,7 nm mit einem Standardfehler von +/- 14,3 nm (siehe Abb. 8). Der Modalwert der Proben war 46,6 nm. Der D90- Wert lag bei 162,9 nm +/- 8,9 nm. Dieser Wert sagt aus, dass 90% der Partikel kleiner als 162,9 nm sind. Die Partikelkonzentration der Probe lag bei $3,99 \times 10^{11}$ Partikel/ml.

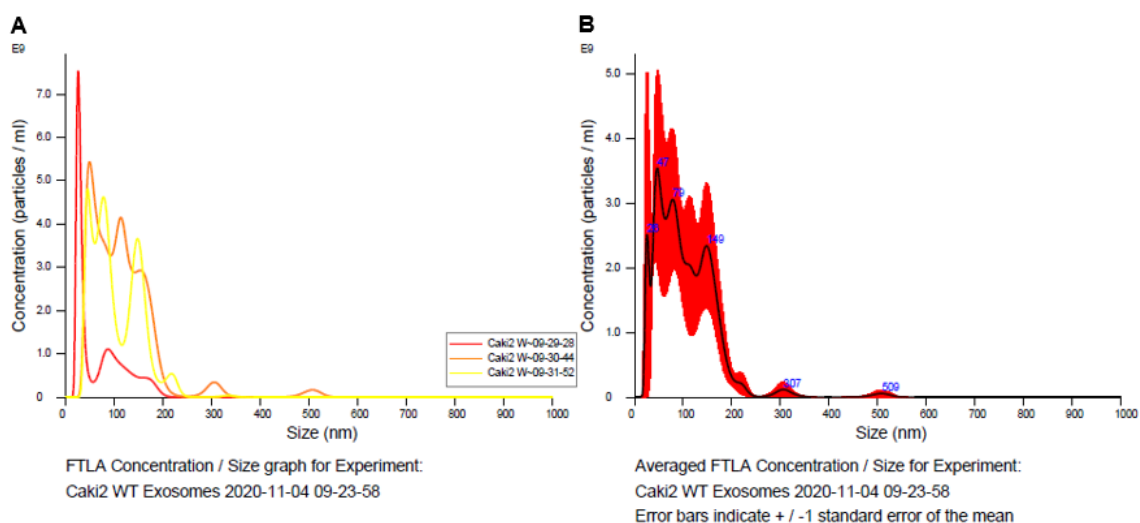


Abbildung 8: Nanotrackinganalyse von Exosomen von Caki-2 Wildtyp-Zellen p.68. **A:** Darstellung der Partikelkonzentration (Partikel/ml) in Relation zu der Partikelgröße (nm) von drei Replikaten der Caki-2 WT Exosomen. **B:** Darstellung der durchschnittlichen Partikelkonzentration und Partikelgröße mit Fehlerindikatoren (rot) der Caki-2 WT Exosomen.

Im Vergleich dazu wurden auch die Exosomenprobe der Caki-2 Sunitinib-resistenten Zellen Passage 68/37 per Nanotracking analysiert (siehe Abb. 9). In der Messung betrug die Durchschnittsgröße der Partikel 92,1 nm mit einem Standardfehler von +/- 2,1 nm. Der Modalwert war bei einer Partikelgröße von 40 nm. Der D90-Wert lag bei 184,8 nm +/- 6,8 nm. Die Partikelkonzentration der Probe betrug $4,09 \times 10^{11}$ Partikel/ml.

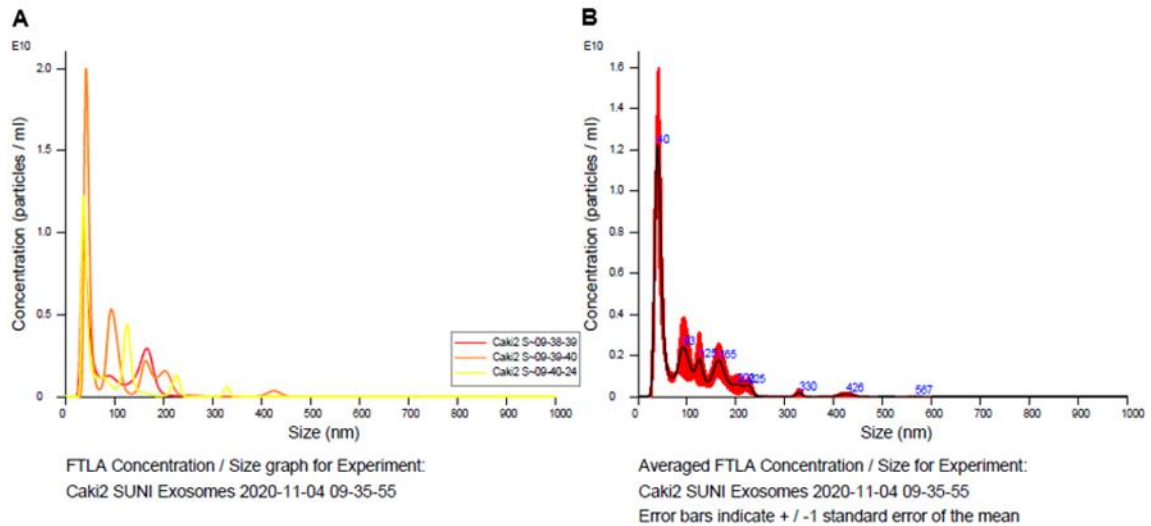


Abbildung 9: Nanotracking Analyse von Exosomen von Sunitinib-resistenten Caki-2 Zellen p.68/37 **A:** Darstellung der Partikelkonzentration (Partikel/ml) in Relation zu der Partikelgröße (nm) von drei Replikaten der Caki-2 Suni Exosomen. **B:** Darstellung der durchschnittlichen Partikelkonzentration und Partikelgröße mit Fehlerindikatoren (rot) der Caki-2 Suni Exosomen.

5.3.2 Nachweis von Exosomenmarker

Mit dem Western Blot Verfahren wurden Exosomenmarker in lysierten Exosomenproben mit Antikörpern sichtbar gemacht.

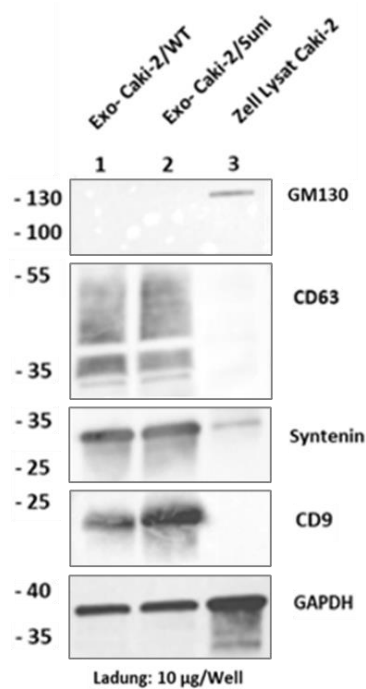


Abbildung 10: Western Blot Analyse von CD63, Syntenin, CD9 und GM130 in Exosomen von Caki-2 Wildtyp (Exo-Caki-2/WT) und Sunitinib-resistenten Zellen (Exo-Caki-2/Suni) sowie im Zelllysate von Caki-2. GAPDH diente als Ladekontrolle.

Die Exosomenmarker CD9 (24 kDa), CD63 (34 – 55 kDa) sowie Syntenin (32 kDa) wurden in Exosomenproben von Caki-2 Wildtyp-Zellen und Caki-2 Zellen mit Sunitinib-Resistenz nachgewiesen (siehe Abb. 10). Der zelluläre Kontaminationsmarker GM130 (130 kDa) detektiert ein Matrix Protein des Golgi-Apparates und konnte nur im Zelllysat nachgewiesen werden.

5.3.3 Inokulationsnachweis mittels Fluoreszenzmarkierung

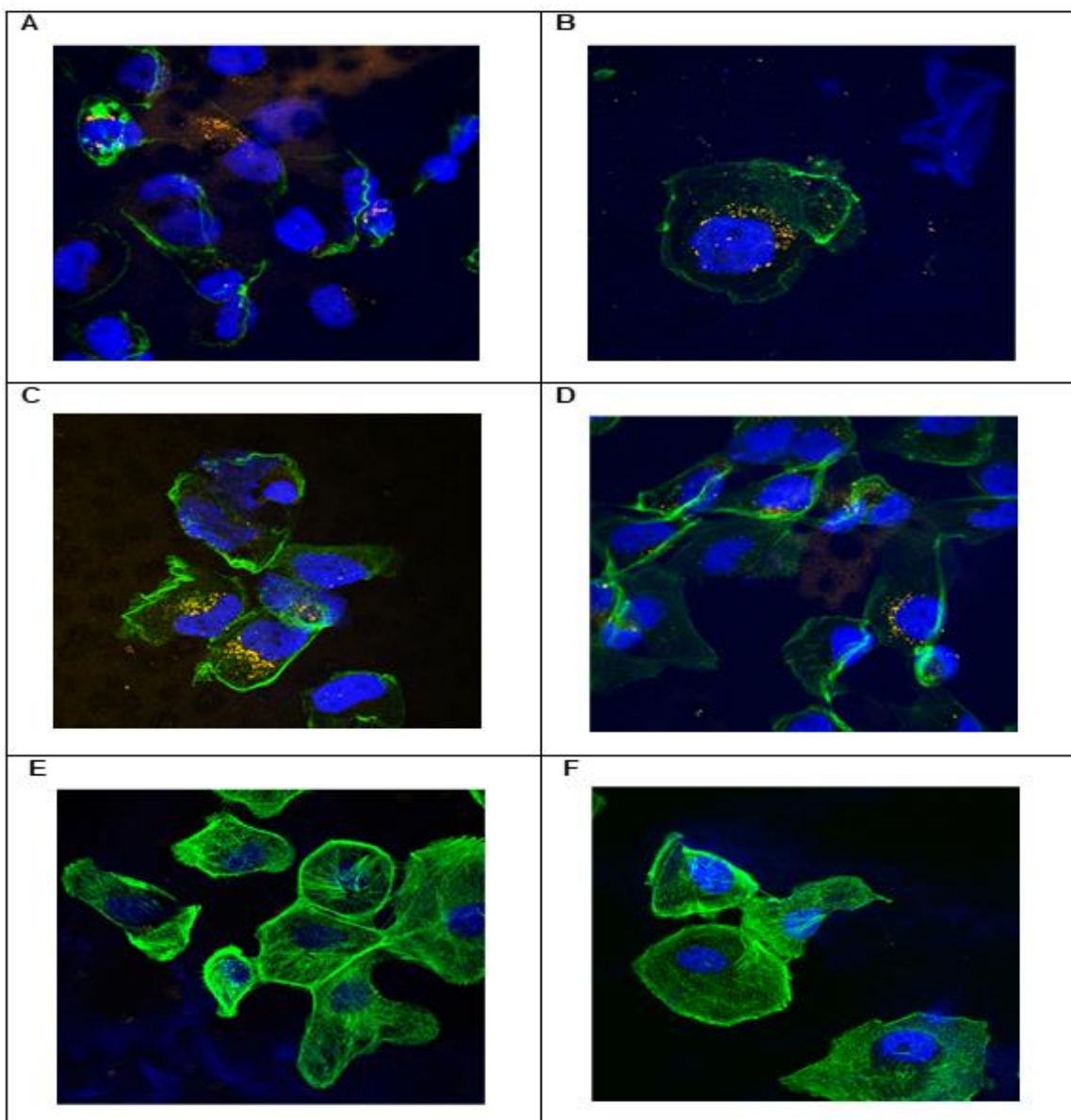


Abbildung 11: Darstellung der Aufnahme von Exosomen (PKH26; Far-red) in Caki-2 Wildtyp-Zellen. Färbung des Nanoskelettes (Phalloidin-iFluor 488 Konjugat; grün) und der Zellkerne (DAPI; blau) mittels Laserscanner (60x Vergrößerung). **A – D:** Die rot gefärbten Exosomen zeigen sich innerhalb des Zytoskeletts in Nähe des Zellkerns. **E/F:** Kontrollzellen ohne Nachweis von Exosomen.

Um die zelluläre Aufnahme von Exosomen darstellen zu können, wurden Exosomen mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff PKH26 angefärbt und mit Caki-2 Wildtyp-Zellen kultiviert. Die rot angefärbten Exosomen sind angereichert in der Nähe der blauen Zellkerne innerhalb des grünen Zytoskeletts zu erkennen (Abb. 11 und 12).

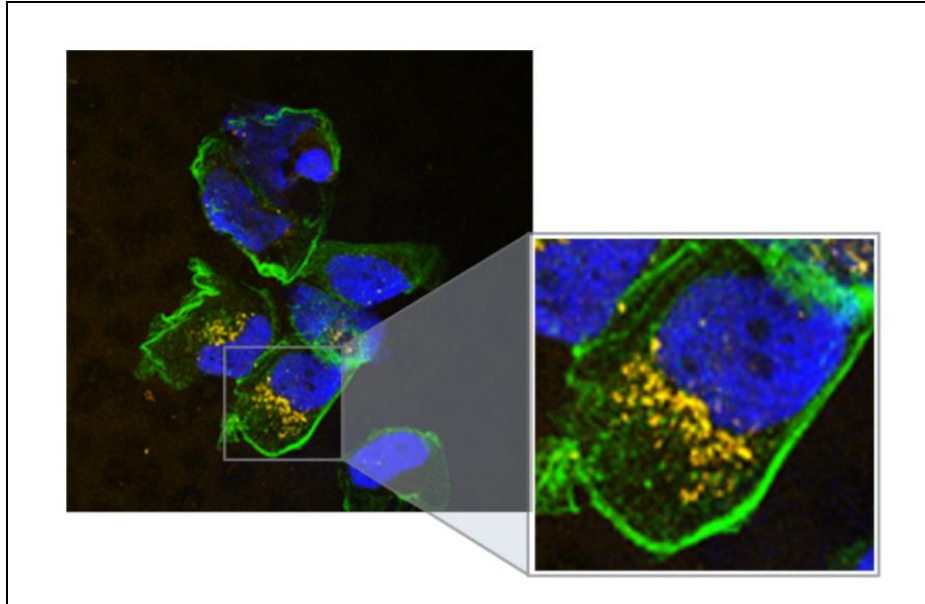


Abbildung 12: Darstellung der Aufnahme von Exosomen (PKH26; Far-red) in Caki-2 Wildtyp-Zellen. Färbung des Nanoskeletts (Phalloidin-iFluor 488 Konjugat; grün) und der Zellkerne (DAPI; blau) mittels Laserscanner (60x Vergrößerung). Eine Nahaufnahme von Bild C aus Abbildung 11.

5.4 Effekt von Exosomen von Sunitinib-resistenten Caki-2 Zellen

Der Versuch wurde insgesamt zwei Mal durchgeführt. Caki-2 Wildtyp-Zellen, welche nur mit PBS behandelt wurden, anstatt mit Exosomen, wiesen unter 3 μM Sunitinib eine Zellviabilität von 61,6 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolllinie auf (siehe Abb. 13). Caki-2 Wildtyp-Zellen, welche dreimal mit Exosomen von Wildtyp-Zellen in den Konzentrationen 8 bzw. 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ stimuliert wurden, hatten eine Zellviabilität von 56,2 % bzw. 56,1 % im Vergleich zur Kontrolllinie ohne Sunitinib. Caki-2 Wildtyp-Zellen, welche wiederum dreimal mit Exosomen von Sunitinib-resistenten Caki-2 Zellen stimuliert wurden, zeigten eine Zellviabilität von 64,3 % bei einer Konzentration von 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Exosomen und eine Zellviabilität von 66,5 % bei einer Exosomenkonzentration von 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ im Vergleich zur Kontrolllinie. Die Sunitinib-resistenten Caki-2 Zellen p.68/37 wiesen unter Sunitinibbehandlung eine Zellviabilität von 78,3 % im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen auf. Diese Zellen wurden nicht mit Exosomen stimuliert.

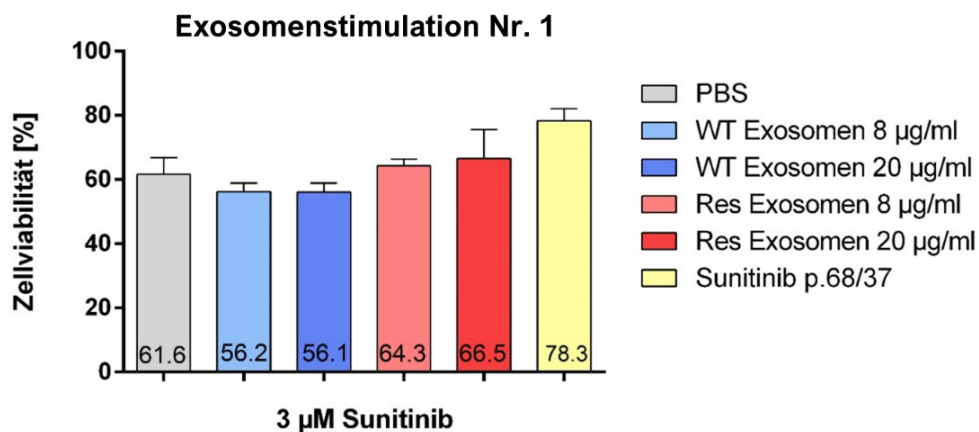


Abbildung 13: Zellviabilitäten von Caki-2 Wildtyp-Zellen der Passage 68 mit Exosomen von Caki-2 Wildtyp-Zellen (WT Exosomen; blau) oder Exosomen von Sunitinib-resistenten Zellen (Res Exosomen; rot) in den Konzentrationen 8 bzw. 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oder PBS (grau) unter Behandlung mit 3 μM Sunitinib. Als Positivkontrolle wurden Sunitinib-resistente Caki-2 Zellen der Passage 71 (p.71/40; gelb) verwendet. Die Zellviabilität der Negativkontrolle (ohne Sunitinibbehandlung) wurde auf 100 % gesetzt und die Zellviabilitäten der mit Sunitinib behandelten Zellen darauf normalisiert. Die Balken zeigen die durchschnittliche Zellviabilität der biologischen Replikate. Die Fehlerbalken geben die durchschnittliche Standardabweichung an.

Vergleicht man nun die einzelnen Zellviabilitäten miteinander, haben Caki-2 Wildtyp-Zellen, welche mit Exosomen von Sunitinib-resistenten Zellen in einer Konzentration von 8 µg/ml behandelt wurden eine Zellviabilität von 122,4 %, im Vergleich zu Wildtyp-Zellen, welche mit Wildtyp Exosomen der gleichen Konzentration behandelt wurden (siehe Abb. 14). Unter einer Exosomenstimulation mit 20 µg/ml Exosomen von Sunitinib-resistenten Zellen lag die Zellviabilität bei 151,3 % im Vergleich zu den Wildtyp Exosomen.

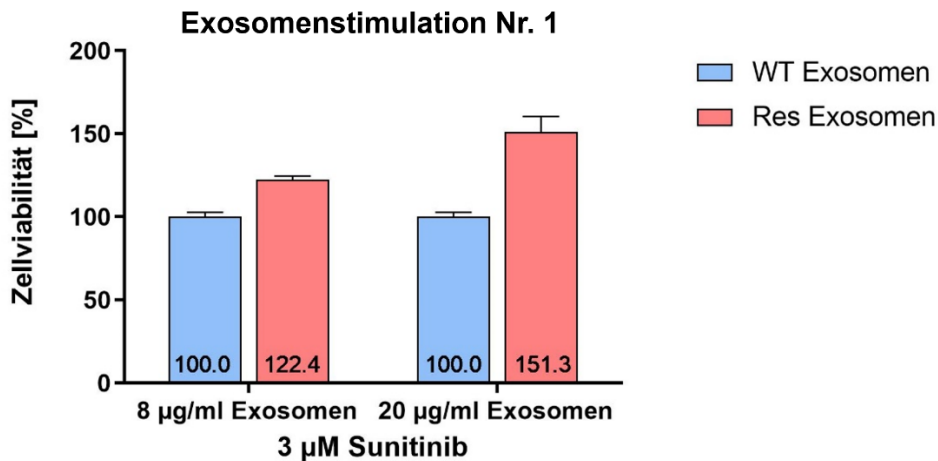


Abbildung 14: Relative Zellviabilitäten. Die Zellviabilität der Versuchszellen unter Behandlung mit 3 µM Sunitinib, welche Exosomen von Wildtyp-Zellen (WT Exosomen; blau) in den Konzentrationen 8 bzw. 20 µg/ml erhielten, wurde auf 100 % gesetzt. Die Zellviabilitäten der Zellen, welche mit Exosomen von Sunitinib-resistenten Zellen (Res Exosomen; rot) stimuliert wurden, wurden darauf normalisiert. Die Fehlerbalken geben die durchschnittliche Standardabweichung an.

Der Versuch wurde wiederholt. Caki-2 Wildtyp-Zellen, welche nur mit PBS behandelt wurden, hatten eine Zellviabilität von 61,0 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolllinie (siehe Abb. 15). Caki-2 Wildtyp-Zellen, welche mit Exosomen von Caki-2 Wildtyp-Zellen in den Konzentrationen 8 bzw. 20 µg/ml stimuliert wurden, wiesen eine Zellviabilität von 60,4 bzw. 61,6 % unter 3 µM Sunitinib auf. Die Zellviabilität von Caki-2 Wildtyp-Zellen, welche mit Exosomen von Sunitinib-resistenten Caki-2 Zellen stimuliert wurden, betrug bei einer Exosomenkonzentration von 8 µg/ml 62,4 % und bei einer Konzentration von 20 µg/ml 72,5 % im Vergleich zur Kontrolllinie. Die Sunitinib-resistenten Zellen (Sunitinib) hatten eine Zellviabilität von 80,4 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolllinie.

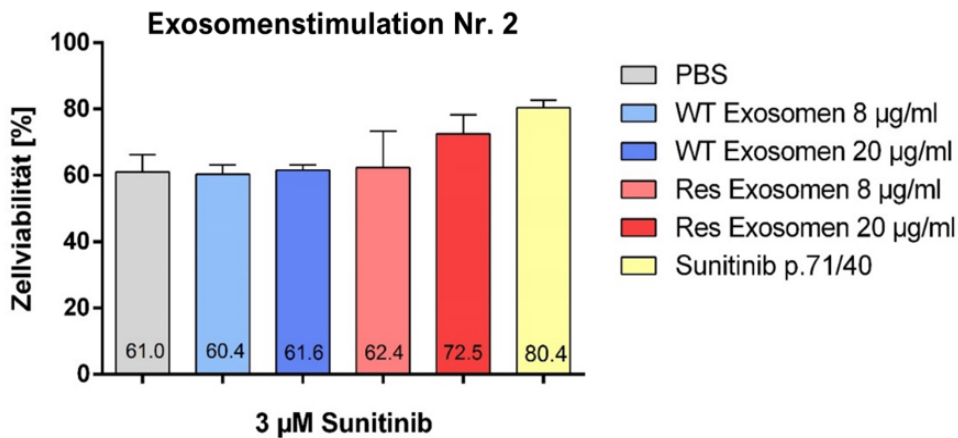


Abbildung 15: Zellviabilitäten von Caki-2 Wildtyp-Zellen der Passage 71 mit Exosomen von Caki-2 Wildtyp-Zellen (WT Exosomen; blau) oder Exosomen von Sunitinib-resistenten Zellen (Res Exosomen; rot) in den Konzentrationen 8 bzw. 20 µg/ml oder PBS (grau) unter Behandlung mit 3 µM Sunitinib. Als Positivkontrolle wurden Sunitinib-resistente Caki-2 Zellen der Passage 71 (p.71/40; gelb) verwendet. Die Zellviabilität der Negativkontrolle wurde auf 100 % gesetzt und die Zellviabilitäten der mit Sunitinib behandelten Zellen darauf normalisiert. Die Balken zeigen die durchschnittliche Zellviabilität der biologischen Replikate. Die Fehlerbalken geben die durchschnittliche Standardabweichung an.

Vergleicht man die Zellviabilitäten der Zellen direkt miteinander, so liegt die Zellviabilität von Wildtyp-Zellen mit 8 µg/ml Exosomen von Sunitinib-resistenten Zellen bei 100,2 % unter 3 µM Sunitinib im Vergleich zur Stimulation mit Wildtyp Exosomen in gleicher Konzentration (siehe Abb. 16). Wildtyp-Zellen, welche mit 20 µg/ml Exosomen von Sunitinib-resistenten Zellen stimuliert wurden, hatten eine Zellviabilität von 126,2 % unter Sunitinibbehandlung im Vergleich zu den Zellen, welche Wildtyp Exosomen in der gleichen Konzentration erhalten haben.

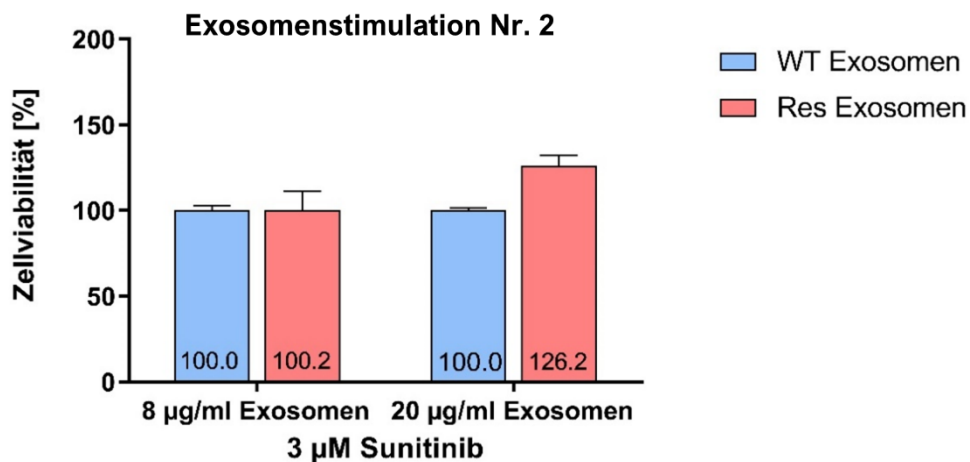


Abbildung 16: Relative Zellviabilitäten. Die Zellviabilität der Versuchszellen unter Behandlung mit 3 µM Sunitinib, welche Exosomen von Wildtyp-Zellen (WT Exosomen; blau) in den Konzentrationen 8 bzw. 20 µg/ml erhielten, wurde auf 100 % gesetzt. Die Zellviabilitäten der Zellen, welche nach mit Exosomen von Sunitinib-resistenten Zellen (Res Exosomen) stimuliert wurden, wurden darauf normalisiert. Die Fehlerbalken geben die durchschnittliche Standardabweichung an.

Die statistische Auswertung erfolgte an den durchschnittlichen Daten der oben beschriebenen Versuche. Caki-2 Wildtyp-Zellen, welche PBS erhielten, hatten unter 3 μ M Sunitinib eine Zellviabilität von durchschnittlich 61.3 % im Vergleich zur Kontrolllinie ohne Sunitinibbehandlung (siehe Abb. 17). Wildtyp-Zellen, welche mit 8 bzw. 20 μ g/ml Wildtyp Exosomen behandelt wurden, wiesen eine Zellviabilität von 58.6 bzw. 59.2 % im Vergleich zu den Kontrollzellen auf. Bei Wildtyp-Zellen, welche wiederum mit Exosomen von Sunitinib-resistenten Caki-2 Zellen stimuliert wurden, lag die Zellviabilität bei 63.3 bzw. 69.6 %. Die Sunitinib-resistenten Zellen hatten unter einer Behandlung von 3 μ M Sunitinib die höchste Zellviabilität von 79.5 %. Vergleicht man nun die Zellviabilitäten der Versuchsgruppen untereinander, zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp-Zellen, welche 20 μ g/ml von Wildtyp Exosomen erhalten haben und Wildtyp-Zellen, welche 20 μ g/ml von Sunitinib-resistenten Zellen erhalten haben ($p= 0,0034$). Die Zellviabilitäten der Zellen, welche 8 μ g/ml Exosomen von Wildtyp bzw. Sunitinib-resistenten Zellen erhielten, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen, welche mit PBS, anstatt mit Exosomen behandelt wurden, zeigten Zellen, welche 20 μ g/ml Exosomen von Sunitinib-resistenten Zellen erhielten, einen signifikanten Unterschied in der Zellviabilität. Der p-Wert liegt hier bei 0,027. Auch die Zellviabilitäten der Zellen, welche 8 bzw. 20 μ g/ml Exosomen von Sunitinib-resistenten Zellen erhielten, unterscheiden sich signifikant mit einem p-Wert von 0,013.

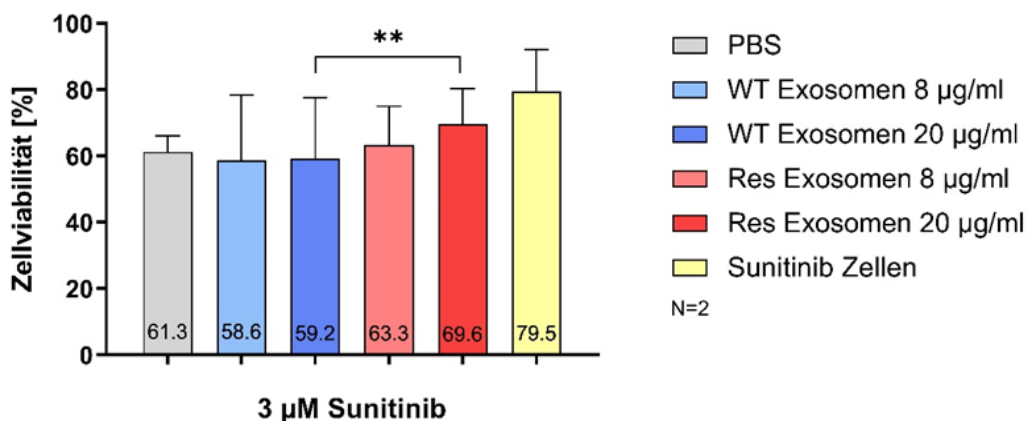


Abbildung 17: Zellviabilitäten von Caki-2 Wildtyp-Zellen mit Exosomen von Caki-2 Wildtyp-Zellen (WT Exosomen; blau) oder Exosomen von Sunitinib-resistenten Zellen (Res Exosomen; rot) in den Konzentrationen 8 bzw. 20 μ g/ml oder PBS (grau) unter Behandlung mit 3 μ M Sunitinib. Als Positivkontrolle wurden Sunitinib-resistente Caki-2 Zellen der (Sunitinib Zellen; gelb) verwendet. Die Zellviabilität der Negativkontrolle wurde auf 100 % gesetzt und die Zellviabilitäten der behandelten Zellen darauf normalisiert. Die Balken zeigen die durchschnittliche Zellviabilität der biologischen Replikate aus zwei Versuchen (N=2). Die Fehlerbalken geben die durchschnittliche Standardabweichung an. (**; p -Wert < 0,01)

Im Durchschnitt lag die Zellviabilität von Zellen, welche mit 8 µg/ml Exosomen von Sunitinib-resistenten Zellen behandelt wurden, unter Gabe von 3 µM Sunitinib um 9,2 % höher als die, welche die gleiche Konzentration Wildtyp Exosomen erhielten (siehe Abb. 18). Dies ist nicht signifikant. Zellen, welche hingegen 20 µg/ml Exosomen von Sunitinib-resistenten Zellen erhielten, hatten eine um 36.6 % höhere Zellviabilität, als Zellen, welche mit der gleichen Konzentration von Wildtyp Exosomen behandelt wurden. Dies ist statistisch signifikant ($p=0,0034$).

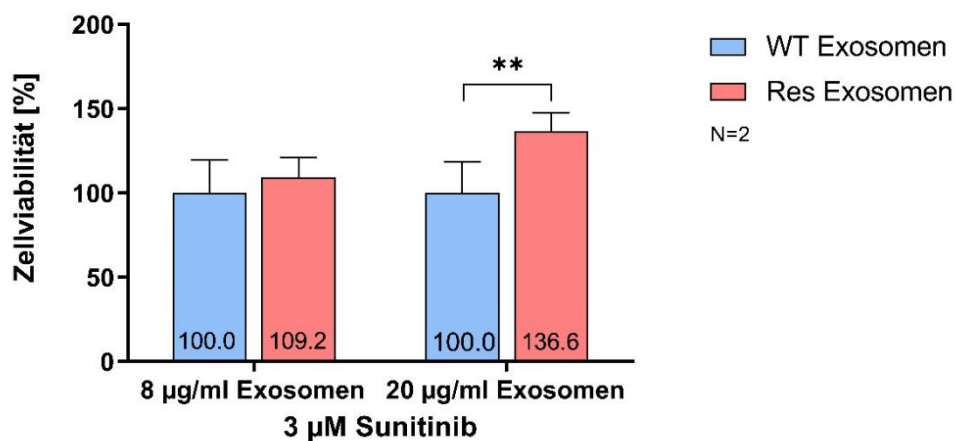


Abbildung 18: Relative Zellviabilitäten. Die Zellviabilität der Versuchszellen unter Behandlung mit 3 µM Sunitinib, welche Exosomen von Wildtyp-Zellen (WT Exosomen; blau) in den Konzentrationen 8 bzw. 20 µg/ml erhielten, wurde auf 100 % gesetzt. Die Zellviabilitäten der Zellen, welche mit Exosomen von Sunitinib-resistenten Zellen (Res Exosomen; rot) stimuliert wurden, wurden darauf normalisiert. Die Fehlerbalken geben die durchschnittliche Standardabweichung an. (**; p -Wert < 0,01)

6. Diskussion

12 - 17 % aller Patienten mit NZK weisen schon bei Diagnosestellung Metastasen auf und bis zu 30% entwickeln metachrone Metastasen (Mao et al., 2021). Das mediane Überleben von metastasierten Patienten liegt bei 15 Monaten mit einer 5- Jahres-Überlebenschance von unter 10 % (Vera-Badillo et al., 2015). Durch die Resistenz des NZK gegenüber konventioneller Chemotherapie und Radiotherapie ist man in der Therapie auf die Verwendung von Immuntherapeutika und TKIs angewiesen. Die systemische Therapie mit TKIs wie Sunitinib verlängern das progressionsfreie Überleben der Patienten signifikant (Motzer, Hutson, et al., 2009; Motzer et al., 2013). Jedoch tritt nach 6 bis 15 Monaten eine Resistenzentwicklung gegen die Therapie mit Sunitinib auf (Rini & Atkins, 2009). Verschiedene Mechanismen der Resistenzentwicklung wurden in den letzten Jahren entdeckt. Hierbei lässt sich zwischen einer intrinsischen und extrinsischen Resistenz unterscheiden. Die Resistenzübertragung über extrazelluläre Vesikel wie Exosomen von resistenten Tumorzellen

auf nicht resistente Tumorzellen wird in anderen Tumorentitäten beschrieben und spielt auch beim metastasierten Nierenzellkarzinom eine Rolle (Qu et al., 2016; Steinbichler et al., 2019). Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Resistenzübertragung gegen Sunitinib von resistenten Zellen auf sensible Zellen über exosomalen Transfer.

6.1 Ermittlung des Effektes von Sunitinib auf die Zellviabilität

6.1.1 Etablierung der Sunitinib-resistenten Zelllinie

Um die Hypothese zu testen, ob Exosomen von Sunitinib-resistenten Zellen eine Resistenz gegen Sunitinib auslösen können, wurde zuerst eine Sunitinib-resistente Caki-2 Zelllinie in unserer Arbeitsgruppe etabliert und für meine Arbeit zur Verfügung gestellt. Der Effekt von Sunitinib auf die Zellviabilität von Caki-2 Wildtyp-Zellen und Caki-2 Zellen mit Sunitinib-Resistenz wurden mittels des WST-1 Cell Viability Tests ermittelt. Bei einer Behandlung mit 5 μM Sunitinib (IC₅₀-Konzentration) unterschied sich die Zellviabilität von Sunitinib-resistenten Zellen jedoch nicht signifikant von denen der analysierten Wildtyp-Zellen. Des Weiteren war die Kultivierung der Zellen unter einer chronischen Behandlung mit 5 μM Sunitinib nicht länger als 2 Passagen möglich, da diese nicht proliferierten. Daraufhin wurde die chronische Behandlung auf die IC₄₀-Konzentration von 3 μM Sunitinib reduziert und Zellen einer späteren Passage verwendet. Im anschließenden Versuch zeigten die Sunitinib-resistenten Zellen unter einer Behandlung mit 3 μM und 5 μM Sunitinib eine erhöhte Zellviabilität im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Zellviabilität der Sunitinib-resistenten Zellen war unter einer Behandlung 3 μM Sunitinib signifikant höher als die des Wildtyps. Aufgrund der erhöhten Zellviabilität unter Sunitinibbehandlung im Vergleich zur Kontrolllinie konnte von einer Resistenzentwicklung ausgegangen werden. Die Etablierung Sunitinib-resistenter Zelllinien ist jedoch nicht einheitlich definiert und wird in der Literatur unterschiedlich durchgeführt. Der ermittelte IC₅₀-Wert wird jedoch meist als Konzentration für die chronische Behandlung mit Sunitinib verwendet. Kamli et al. behandelte Caki-2 Zellen für 12 Monate mit 10 μM Sunitinib, ohne die Konzentration zu erhöhen oder die Gabe zu unterbrechen (Kamli et al., 2018). Diese Zellen zeigten im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp keinen signifikanten Unterschied in der Wachstumsrate, jedoch morphologische Veränderungen wie Zell- und Nukleushypertrophie. Im Gegensatz dazu wiesen die Sunitinib-resistenten Caki-2 Zellen meiner Arbeit eine vergleichbare Morphologie, jedoch eine geringere Wachstumsrate als der unbehandelte Wildtyp auf. Desweiteren wurde das Zellkulturmedium in der regulären Zellkultur nicht zusätzlich mit Antibiotika versetzt, um mögliche unerwünschte Wechselwirkungen mit Sunitinib zu verhindern. Andere Arbeitsgruppen steigern die Konzentration des Medikamentes über die

Dauer der Zellkultur. Prior et al. behandelten Caki-2 Wildtyp-Zellen initial mit 8 μM Sunitinib und steigerten diese innerhalb von 4 Monaten auf 14 μM Sunitinib (Prior et al., 2014). Die 8 μM Sunitinib entsprachen dem vorher ermittelten IC50-Wert. Die Messung der Zellviabilität erfolgte mittels MTT-Assay.

6.2 Isolation und Qualitative Analyse von Exosomen

6.2.1 Isolation von Exosomen

Die Ultrazentrifugation gilt als Goldstandard in der Isolation von Exosomen. Mit circa 80 % ist sie die am häufigsten verwendete primäre Isolationstechnik (Gardiner et al., 2016). Weitere Methoden sind die Polymer-Präzipitation, Ultrafiltration, Größenausschlusschromatographie oder Kombinationen aus mehreren Techniken. Die internationale Gesellschaft für extrazelluläre Vesikel (ISEV) legt sich in ihren Richtlinien jedoch nicht auf eine optimale Isolationsmethode für extrazelluläre Vesikel fest (Théry et al., 2018). Im Vergleich mit anderen Isolationstechniken zeigt die Ultrazentrifugation zwar eine geringere Ausbeute an isolierten Exosomen, jedoch ist die Reinheit der Partikel im Vergleich zu Isolationskits höher (G. K. Patel et al., 2019; Tang et al., 2017). Eine Verunreinigung der Proben durch andere extrazelluläre Vesikel oder Chemikalien wird somit reduziert, wobei eine reine Isolation von Exosomen nicht möglich ist. Nachteile der Ultrazentrifugation liegen in den Anschaffungskosten, der langen Zentrifugationszeit von 4 - 5 Stunden sowie der Proteinaggregation und Co-Isolation von anderen Proteinen (Abramowicz et al., 2016).

In dieser Arbeit wurden insgesamt sieben Exosomenproben von Caki-2 Wildtyp-Zellen und Sunitinib-resistenten Zellen mittels differentieller Ultrazentrifugation isoliert und mittels BCA Protein Assay quantifiziert. Besonders die Menge der Exosomen von Sunitinib-resistenten Zellen schwankte, obwohl Kultur- und Isolationsprotokolle identisch durchgeführt wurden. Die Faktoren, welche die Menge an abgegebenen Exosomen beeinflussen können, sind hierbei vielfältig. Die Passage der Zellen hat einen Einfluss auf die Exosomensekretion und deren Inhalt. Es konnte aufgezeigt werden, dass die Anzahl der Exosomen von Passage zu Passage variiert und die Funktion der Exosomen von älteren Zellen abgeschwächt ist (Umezu et al., 2017). In meiner Arbeit wurden die Versuche mit möglichst identischen Passagen oder nahe beieinander liegenden Passagen durchgeführt, um dies zu vermeiden. Die Wildtyp-Zellen wurden parallel kultiviert und hatten in den Versuchen immer die gleiche Passage wie die Sunitinib-resistenten Zellen. Des Weiteren können exogene Faktoren wie Hypoxie, oxidativer Stress sowie der pH-Wert die Exosomensekretion von Tumorzellen beeinflussen (Parolini et al., 2009). Die Behandlung mit Sunitinib hat nicht nur einen Einfluss auf die Zellviabilität der

Versuchszellen, sondern auch auf die Sekretion von Exosomen. Zelllinien des NZK wie 786-O wiesen unter Behandlung mit 1 μM und 5 μM Sunitinib eine signifikant erhöhte Abgabe von extrazellulären Vesikeln auf. Die Steigerung verlief hierbei in Abhängigkeit von der Sunitinibkonzentration (Lim et al., 2021). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass bei diesen Zellen keine Resistenz gegenüber Sunitinib induziert wurde und somit die erhöhte Freigabe von Exosomen eine Reaktion auf die Medikation darstellen könnte.

6.2.2 Charakterisierung von Exosomen

Die Charakterisierung der Exosomen erfolgte in dieser Arbeit mittels Nanotracking Analyse, Western Blot und der Fluoreszenzmarkierung von Exosomen.

Die Konzentration und Größe der Exosomenproben wurden mithilfe der Nanotracking Analysis ermittelt. Die Nanotracking Analysis ist ein Verfahren, welches Teilchen von einer Größe bis zu 10 nm anhand der Brownschen Molekularbewegung mithilfe eines Lasers messen kann. Sie gilt neben der Durchflusszytometrie als Goldstandard für die Charakterisierung von extrazellulären Vesikeln (Soo et al., 2012). Vorteile liegen in der hohen Auflösung, jedoch kann in den Proben nicht zwischen Exosomen und kontaminierenden Proteinen unterschieden werden (Y. Zhang et al., 2020). In meiner Arbeit unterschied ich die Größe der Exosomen nicht signifikant zwischen resistenten und Wildtypzellen. Himbert et al. isolierte Exosomen der Zelllinie Caki-2 mit einer durchschnittlichen Größe von 119,0 nm (Himbert et al., 2020). Die Proben liegen also im Referenzbereich für Exosomen, welche zwischen 30 – 150 nm groß sein können (Colombo et al., 2014).

Neben der Analyse der Größe und Konzentration der Exosomenproben wurden die isolierten Exosomen mittels Western Blot Verfahren auf die Exosomenmarker CD9, CD63 und Syntenin untersucht. Die internationale Gemeinschaft für extrazelluläre Vesikel (ISEV) definierte für die Charakterisierung von Exosomen mehrere Kriterien, um Exosomen und deren Reinheit in einer Probe sicher zu identifizieren (Théry et al., 2018). Erstens sollen unspezifische und gewebespezifische Transmembranproteine oder Glykosylphosphatidylinositol-verankerte Proteine der Plasmamembran dargestellt werden. Hierzu zählen die Tetraspanine CD63, CD81, CD82, CD9. Des Weiteren soll der Nachweis von zytosolischen Proteinen wie der ESCRT-Proteine Syntenin, Flotillin und Anderen erfolgen. Die Abwesenheit von Kontaminationsmarkern, wie GM130, spricht für die Reinheit der Probe. Dies ist ein Matrixprotein des Golgi-Apparates, welches nicht in exosomalen Proben auffindbar ist. Das Western Blot Verfahren gilt als Standardmethode für die Darstellung von exosomalen Markern, besonders aus Zellmedium (Théry et al., 2018). Alle untersuchten Exosomenmarker (CD9,

CD63 und Syntenin) konnten erfolgreich in den Exosomenproben nachgewiesen werden. Der Kontaminationsmarker GM130 war in beiden Exosomenproben negativ. Als Kontrolle diente hierbei Caki-2 Zelllysate. Andere Arbeitsgruppen verwendeten auch CD63 und CD9 als Marker für Exosomen der Zelllinie Caki-2 (Greenberg et al., 2021; Himbert et al., 2020).

Die zelluläre Aufnahme von Exosomen wurde mittels Fluoreszenzmarkierung nachgewiesen und mittels Laserscanner detektiert. Die Verwendung von fluoreszierenden, lipophilen Farbstoffen wie PKH26 gelten als Standard in der Detektion von extrazellulären Vesikeln. Es ist jedoch mit dieser Methode nicht möglich, mögliche Fehlfärbungen durch Proteinkontamination der Probe auszuschließen (Takov et al., 2017). Die Exosomen zeigten sich gruppiert innerhalb der angefärbten Zellmatrix in der Nähe des Zellkerns. Deshalb kann man von einer Aufnahme der gefärbten Exosomen in die Zelle ausgehen. Die Negativkontrolle zeigte keine rot angefärbten Partikel.

6.3 Ermittlung des Effektes von Exosomen

6.3.1 Stimulation von Caki-2 Wildtyp-Zellen mit Exosomen

Um den Effekt der Exosomen von Zellen mit Sunitinib-Resistenz analysieren zu können, wurden Caki-2 Wildtyp-Zellen dreimal mit einer Exosomenkonzentration von 8 µg/ml bzw. 20 µg/ml über 72 Stunden behandelt. Die Kontrollgruppe wurde mit Exosomen von Caki-2 Wildtyp-Zellen in den gleichen Konzentrationen behandelt, um das physiologische Mikromilieu von Tumoren möglichst realitätsnah zu simulieren. Außerdem hat die Gabe von Exosomen an sich einen Effekt auf die Zellviabilität der Zellen, welcher das Ergebnis dieser Arbeit verzerren könnte.

Effekt von Exosomen ohne Sunitinib

Die Gabe von Wildtyp Exosomen auf Caki-2 Wildtyp-Zellen resultierte in einer verringerten Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle, welche mit PBS behandelt wurde. Dies ist interessant, da tumoreigene Exosomen in der Literatur als Förderer der Proliferation von Nierenzellkarzinomen beschrieben werden (XIAO & SHI, 2020; W. Zhang et al., 2022). Die Wirkung von Wildtyp Exosomen im NZK, insbesondere bei Caki-2 Zellen wurde jedoch bisher noch nicht ausreichend untersucht. Eine hemmende Wirkung auf die Zellviabilität bei Caki-2 Zellen wurde nach aktuellem Wissensstand noch nicht beschrieben. Es ist jedoch bekannt, dass extrazelluläre Vesikel den Zellzyklus von Tumorzellen anti-apoptotisch beeinflussen, indem Apoptose-fördernde Signalproteine wie Caspase-3 in extrazellulären Vesikeln in den EZR abgegeben werden können (Böing et al., 2013). Die Aufnahme von Caspase-3

angereicherten Vesikeln könnte zu einer verringerten Zellviabilität in Wildtyp-Zellen führen. Es wären jedoch genauere Untersuchungen der Wildtyp Exosomen nötig, um deren Inhalt und Effekt auf Wildtyp-Zellen zu erörtern.

Die Gabe von Exosomen resistenter Zellen induziert eine erhöhte Zellviabilität von Wildtyp-Zellen im Vergleich zu deren eigenen Exosomen. Somit wurde eine viabilitätsfördernde Wirkung der Exosomen resistenter Zellen aufgezeigt. Im Vergleich mit Zellen, welche nur PBS erhielten, zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied der Zellviabilität. Aufgrund dessen sind Kontrollzellen mit Wildtyp Exosomen notwendig, da sie die Versuchsbedingungen realistischer darstellen.

Effekt von Exosomen mit Sunitinib

Die Gabe von Exosomen von Sunitinib-resistenten Zellen an Wildtyp-Zellen resultierte in einer signifikant besseren Zellviabilität unter Behandlung mit Sunitinib. Dies lässt darauf schließen, dass Induktoren der Resistenz in Exosomen transportiert und an andere Zellen weitergegeben werden können. Dies konnte in den letzten Jahren in anderen Medikationen und Entitäten bereits nachgewiesen werden. Transportproteine der ATB-binding-casette-Familie (ABC), wie p-Glykoprotein (pGp), reduzieren die intrazelluläre Medikamentenkonzentration (Leonard et al., 2003). In über 50 % aller multi-drug-resistenten-Tumore wird pGp exprimiert (Moitra et al., 2011). P-Glykoprotein und andere Transporter werden über Exosomen an Therapie-sensitive Zellen transferiert und induzieren eine Resistenz (Bebawy et al., 2009). Santos et al. wiesen die Weitergabe der Chemoresistenz gegen Doxorubicin und Paclitaxel über Exosomen in vitro bei Zelllinien des Mammakarzinoms nach (Santos et al., 2018). Sie konnten aufzeigen, dass chemoresistente Zelllinien mehr Exosomen sekretieren als der Wildtyp und diese über die miR-155 eine Chemoresistenz induzieren können. Die Resistenzübertragung über Exosomen in Mammakarzinom-Zelllinien konnte auch für Adriamycin und Docetaxel nachgewiesen werden (W. X. Chen et al., 2014). Hierbei wurden die Exosomen in einer Konzentration von 20 µg/ml auf 1×10^5 Zellen pro Well gegeben. Fan et al. wies in vitro die Transmission der Resistenz gegen Gemcitabin über exosomalen Transfer in Zelllinien des Pancreaskarzinoms nach (Fan et al., 2018). Hierbei wurden auch Exosomen in einer Konzentration von 20 µg/ml verwendet. Die Behandlungsdauer lag bei 72 Stunden. Dies stimmt mit der Vorgehensweise in meiner Arbeit überein. Jedoch ist nicht bekannt, wie hoch die Exosomenkonzentration in vivo im Tumorgewebe des NZK liegen, was wiederum die Limitationen in der Aussagekraft dieser Arbeit aufzeigt. In meiner Arbeit zeigte sich, dass die Resistenz gegenüber Sunitinib, welche über exosomalen Transfer auf Wildtyp-Zellen übertragen wurde, von der Exosomenkonzentration abhängig ist. So wurde bei einer Konzentration von 20 µg/ml eine signifikant erhöhte Zellviabilität von Wildtyp-Zellen gegenüber Sunitinib festgestellt. Bei einer Konzentration von 8 µg/ml konnte dieser Effekt jedoch nicht signifikant nachgewiesen werden.

Dies weist auf eine Dosis-Wirkungs-Beziehung von Caki-2 Exosomen in der Resistenzbildung gegen Sunitinib in Wildtyp-Zellen hin.

6.4 Resistenz gegen Sunitinib im NZK

Durch die Einführung der TKI in die Erstlinientherapie des metastasierten NZK konnte das progressionsfreie Überleben von Patienten im Vergleich zu der damals gängigen Interferontherapie signifikant verlängert werden (Motzer et al., 2007). Der TKI Sunitinib steht neben PD-L1-Inhibitoren weiterhin als Option in der empfohlenen Erstlinientherapie des metastasierten NZK (Leitlinienprogramm Onkologie Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, 2023). Die Resistenzentwicklung gegen Sunitinib ist keine Seltenheit und erfordert eine Dosisanpassung oder den Wechsel auf eine andere Medikation. Ziel ist es, die Wirkmechanismen der Resistenzentwicklung gegen Sunitinib, besonders durch Exosomen genauer zu verstehen, um neue Behandlungsstrategien für Patienten zu etablieren. Die durchgeführte Arbeit erörtert den Transfer von einem Sunitinib-resistenten Phänotyp via exosomalen Vesikeln von resistenten zu nicht-resistenten Caki-2 Nierenzellkarzinomzellen, jedoch lässt sie noch keine Rückschlüsse auf die molekularen Mechanismen der Resistenzentwicklung und deren Weitergabe zu. Hierfür wären weitere Untersuchungen, wie die Analyse des Inhalts der Exosomen von Sunitinib-resistenten Zellen im Vergleich zu Exosomen von Wildtyp-Zellen notwendig. Die Mechanismen der Resistenzentwicklung gegen Sunitinib und Weitergabe über exosomalen Transfer sind hierbei komplex und nicht auf einzelne Faktoren zurückzuführen. Das Verständnis dieser Mechanismen ist die Grundlage für die Entwicklung von effektiven Behandlungsstrategien zur Prävention und Überwindung der Resistenz gegen Sunitinib und ist somit verbunden mit einem besseren Therapiekonzept für Patienten mit metastasierten NZK. Aktuelle Studien widmen sich der Erforschung dieser Wirkmechanismen.

Qu et al. konnte in vivo die long non-coding RNA ARSR (LncARSR) als einen Mediator der Sunitinib Resistenz im NZK nachweisen (Qu et al., 2016). Sunitinib-resistente 786-O Zellen wiesen signifikant höhere Level von LncARSR auf als Wildtyp-Zellen. Dies wurde im Mausmodell und mit Patientenproben bestätigt. Ein Knockdown von LncARSR in resistenten Zellen erhöhte die Sensitivität zu Sunitinib in vivo signifikant. Desweiteren konnte aufgezeigt werden, dass in Exosomen von Sunitinib-resistenten Zellen die Konzentration von LncARSR signifikant höher war als die von Wildtyp-Zellen. Wildtyp-Zellen, welche mit diesen Exosomen behandelt wurden, zeigten eine verringerte Sensitivität gegenüber Sunitinib. Daraus schlossen die Autoren auf einen exosomalen Transfer von LncARSR, welche eine Resistenz gegenüber

Sunitinib in Wildtyp-Zellen induziert. LncARSR reguliert hierbei die miRNAs miR-34 und miR-449, welche die Expression von AXL und c-Met fördern. AXL und c-Met sind beschriebene Mediatoren der Therapieresistenz in NZK und gelten als potentielles therapeutisches Ziel, um diese zum Beispiel mit Cabozantinib, einem anderen TKI, zu überwinden (Marona et al., 2019; Zhou et al., 2016). Die Ergebnisse meiner Arbeit bestätigen die hier aufgeführten Ergebnisse über die Rolle von Exosomen in der Resistenzübertragung. Ob die LncARSR auch in der Zelllinie Caki-2 des NZK eine Rolle in der Resistenzbildung gegen Sunitinib spielt, muss in fortführenden Experimenten untersucht werden.

Sunitinib-resistente Zellen weisen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen Veränderungen in ihren Stoffwechsel auf. Folgende Publikationen haben weitere Wirkmechanismen der Sunitinib-Resistenz untersucht. Die long non-coding RNA SNHG12 (LncSNHG12) fördert eine Sunitinib Resistenz über CDCA3 im NZK in vitro (Liu et al., 2020). Hierbei konnte aufgezeigt werden, dass LncSNHG12 und CDCA3 in Sunitinib-resistenten Zellen vermehrt exprimiert wird. Diese Expression korreliert negativ mit der Sensitivität gegenüber Sunitinib. Ein Knockdown von LncSNHG12 in vivo verminderte den gemessenen CDCA3 Gehalt im Tumor, sowie die Resistenz des Tumors gegenüber Sunitinib. Auch in anderen Tumorentitäten fördert LncSNHG12 die Proliferation und Resistenz gegenüber Pharmaka (Lu et al., 2020; O. C. Wang et al., 2017; H. Zhang & Lu, 2018). Aufgrund dessen wächst das Interesse an LncSNHG12 als potentiellen Biomarker oder therapeutisches Ziel (Tamang et al., 2019). Ob LncSNHG12, vergleichbar mit LncARSR über exosomalen Transfer an andere Zellen übermittelt wird und dort seine protumoröse Wirkung entfaltet, ist nicht bekannt. Eine weitere long non-coding RNA dient als Mediator der Sunitinib Resistenz. Wang et al. konnten die LncRNA MALAT1 als Modulator von GP3BP1 identifizieren, welches wiederum die Resistenz gegenüber Sunitinib in NZK fördert (Z. Wang et al., 2020). Desweiteren konnten Tsuruda et al. das Protein RAB27B als Exosomen- unabhängigen Mediator der Sunitinib Resistenz identifizieren (Tsuruda et al., 2020). Das onkogene Protein RAB27B ist in Zelllinien des NZK mit und ohne Sunitinib Resistenz angereichert und fördert die Zellproliferation, Migration und Invasivität über die Interaktion mit VEGF und MAPK. Ein Knockdown von EIF3D in der 786-O Zelllinie konnte eine vorher induzierte Sunitinib Resistenz verringern. Es verhindert die Degradierung von GRP78, welches in NZK-Zelllinien die Entstehung der Sunitinib Resistenz vermitteln kann (Huang et al., 2019). Caveolin 1 (CAV1) ist Bestandteil einer Mikrodomäne der zytoplasmatischen Membran und spielt eine Rolle in der intrazellulären Signalübertragung für Zellwachstum und Adhäsion (Tamaskar et al., 2007). Es konnte aufgezeigt werden, dass CAV1 in verschiedenen Tumorentitäten die Proliferation und Entstehung von multi-drug Resistenzen fördert (Ting Tse et al., 2012; Yuan et al., 2013). Auch in Zellkulturen des NZK wurde nachgewiesen, dass CAV1 vermehrt exprimiert wird. Eine Plasmid vermittelte Überexpression von CAV1 führte zu einer Verstärkung der Sunitinib Toleranz (Ruan et al., 2017).

6.5 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit konnte dargestellt werden, dass Caki-2 Zellen, welche chronisch mit Sunitinib behandelt wurden, eine höhere Zellviabilität unter Behandlung mit Sunitinib aufweisen als Wildtyp-Zellen. Dies begründete die Annahme einer erworbenen Sunitinib Resistenz dieser Zellen. Exosomen vom Wildtyp-Zellen sowie von Sunitinib-resistenten Zellen wurden mit hoher Reinheit isoliert und charakterisiert. Exosomen von Sunitinib-resistenten Caki-2 Zellen erhöhen die Zellviabilität von sensitiven Zellen unter Sunitinibbehandlung. Damit wurde die Annahme bestätigt, dass Exosomen eine wichtige Rolle in der Resistenzübertragung auf Sunitinib-sensible Zellen spielen. Dies steht auch im Einklang mit der bereits veröffentlichten Literatur, wobei sich bisher nur eine Arbeit mit dem Nierenzellkarzinom beschäftigt hat. Zukünftig ist es notwendig, diese Ergebnisse mit fortführenden Versuchen zu bestätigen. Darüber hinaus müssen die Resistenzinduktoren identifiziert werden, welche als therapeutische Ziele dienen können, um der Resistenzentstehung entgegenzuwirken und die Behandlung des metastasierten NZKs zu verbessern. Hierzu gehören in vivo Studien, welche in vitro Studien in ihrer Aussagekraft überlegen sind, da sie den Tumor und dessen Mikroenvironment realistischer simulieren können. Diese Forschung wird in der Zukunft die klinischen Behandlungsmethoden des NZK verbessern.

7. Quellenverzeichnis

1. Abels, E. R., Breakefield, X. O. (2016) Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and Molecular Neurobiology* 36:301–312.
2. Abramowicz, A., Widlak, P., Pietrowska, M. (2016) Proteomic analysis of exosomal cargo: The challenge of high purity vesicle isolation. *Molecular BioSystems* 12:1407–1419.
3. Abrams, T. J., Lee, L. B., Murray, L. J., Pryer, N. K., Cherrington, J. M. (2003) SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor β in preclinical models of human small cell lung cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 2:471–478.
4. Algaba, F., Akaza, H., López-Beltrán, A., Martignoni, G., Moch, H., Montironi, R., Reuter, V. (2011) Current Pathology Keys of Renal Cell Carcinoma. *European Urology* 60:634–643.
5. Alonso-Gordoa, T., García-Bermejo, M. L., Grande, E., Garrido, P., Carrato, A., Molina-Cerrillo, J. (2019) Targeting tyrosine kinases in renal cell carcinoma: “New bullets against old guys.” *International Journal of Molecular Sciences* 20:1–24.
6. Bebawy, M., Combes, V., Lee, E., Jaiswal, R., Gong, J., Bonhoure, A., Grau, G. E. R. (2009) Membrane microparticles mediate transfer of P-glycoprotein to drug sensitive cancer cells. *Leukemia* 23:1643–1649.
7. Bekema, H. J., Maclennan, S., Imamura, M., Lam, T. B. L., Stewart, F., Scott, N., Maclennan, G., McClinton, S., Griffiths, T. R. L., Skolarikos, A., Maclennan, S. J., Sylvester, R., Ljungberg, B., N'Dow, J. (2013) Systematic Review of Adrenalectomy and Lymph Node Dissection in Locally Advanced Renal Cell Carcinoma. *European Urology* 64:799–810.
8. Bergers, G., Hanahan, D. (2008) Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nature Reviews Cancer* 8:592–603.
9. Bianchi, M., Sun, M., Jeldres, C., Shariat, S. F., Trinh, Q.-D., Briganti, A., Tian, Z., Schmitges, J., Graefen, M., Perrotte, P., Menon, M., Montorsi, F., Karakiewicz, P. I. (2012) Distribution of metastatic sites in renal cell carcinoma: a population-based analysis. *Annals of Oncology* 23:973–980.
10. Blanchard, N., Lankar, D., Faure, F., Regnault, A., Dumont, C., Raposo, G., Hivroz, C.

- (2002) TCR Activation of Human T Cells Induces the Production of Exosomes Bearing the TCR/CD3/ζ Complex. *The Journal of Immunology* 168:3235–3241.
11. Böing, A. N., Stap, J., Hau, C. M., Afink, G. B., Ris-Stalpers, C., Reits, E. A., Sturk, A., Van Noorden, C. J. F., Nieuwland, R. (2013) Active caspase-3 is removed from cells by release of caspase-3-enriched vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833:1844–1852.
 12. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68:394–424.
 13. Brierley, J. D., Gospodarowicz, M. K., Wittekind, C. (2017) *TNM classification of malignant tumours* John Wiley & Sons.
 14. Brugarolas, J. (2014) Molecular Genetics of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 32:1968–1976.
 15. Buczek, M., Escudier, B., Bartnik, E., Szczylik, C., Czarnecka, A. (2014) Resistance to tyrosine kinase inhibitors in clear cell renal cell carcinoma: From the patient's bed to molecular mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1845:31–41.
 16. Cao, Y., E, G., Wang, E., Pal, K., Dutta, S. K., Bar-Sagi, D., Mukhopadhyay, D. (2012) VEGF exerts an angiogenesis-independent function in cancer cells to promote their malignant progression. *Cancer Research* 72:3912–3918.
 17. Chen, W. X., Liu, X. M., Lv, M. M., Chen, L., Zhao, J. H., Zhong, S. L., Ji, M. H., Hu, Q., Luo, Z., Wu, J. Z., Tang, J. H. (2014) Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of MicroRNAs. *PLoS ONE* 9:.
 18. Chen, Y., Tortorici, M. A., Garrett, M., Hee, B., Klamerus, K. J., Pithavala, Y. K. (2013) Clinical Pharmacology of Axitinib. *Clinical Pharmacokinetics* 52:713–725.
 19. Choueiri, T. K. (2017) Systemic therapy of metastatic renal cell carcinoma. *The New England Journal of Medicine* 376:354–366.
 20. Choueiri, T. K., Escudier, B., Powles, T., Tannir, N. M., Mainwaring, P. N., Rini, B. I., Hammers, H. J., Donskov, F., Roth, B. J., Peltola, K., Lee, J. L., Heng, D. Y. C., Schmidinger, M., Agarwal, N., Sternberg, C. N., Mcdermott, D. F., Aftab, D. T., Hessel,

- C., Scheffold, C., ... Motzer, R. J. (2016) Cabozantinib versus everolimus in advanced renal cell carcinoma (METEOR): final results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 17:917–927.
21. Chow, L. Q. M., Eckhardt, S. G. (2007) Sunitinib: From rational design to clinical efficacy. *Journal of Clinical Oncology* 25:884–896.
 22. Coleman, J. A. (2008) Familial and Hereditary Renal Cancer Syndromes. *Urologic Clinics of North America* 35:563–572.
 23. Colombo, M., Raposo, G., Théry, C. (2014) Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30:255–289.
 24. Crispen, P. L., Breau, R. H., Allmer, C., Lohse, C. M., Cheville, J. C., Leibovich, B. C., Blute, M. L. (2011) Lymph Node Dissection at the Time of Radical Nephrectomy for High-Risk Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Indications and Recommendations for Surgical Templates. *European Urology* 59:18–23.
 25. Delahunt, B., Cheville, J. C., Martignoni, G., Humphrey, P. A., Magi-Galluzzi, C., Mckenney, J., Egevad, L., Algaba, F., Moch, H., Grignon, D. J., Montironi, R., Srigley, J. R. (2013) The International Society of Urological Pathology (ISUP) Grading System for Renal Cell Carcinoma and Other Prognostic Parameters The Members of the ISUP Renal Tumor Panel. *Am J Surg Pathol* 37:1490–1504. www.ajsp.com
 26. Dvorak, H. F. (2002) Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor: A Critical Cytokine in Tumor Angiogenesis and a Potential Target for Diagnosis and Therapy. *Journal of Clinical Oncology* 20:4368–4380.
 27. Eremina, V., Sood, M., Haigh, J., Nagy, A., Lajoie, G., Ferrara, N., Gerber, H.-P., Kikkawa, Y., Miner, J. H., Quaggin, S. E. (2003) Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *Journal of Clinical Investigation* 111:707–716.
 28. Escola, J.-M., Kleijmeer, M. J., Stoorvogel, W., Griffith, J. M., Yoshie, O., Geuze, H. J. (1998) Selective Enrichment of Tetraspan Proteins on the Internal Vesicles of Multivesicular Endosomes and on Exosomes Secreted by Human B-lymphocytes*. *Journal of Biological Chemistry* 273:20121–20127.
 29. Fan, J., Wei, Q., Koay, E. J., Liu, Y., Ning, B., Bernard, P. W., Zhang, N., Han, H., Katz, M. H., Zhao, Z., Hu, Y. (2018) Chemoresistance transmission via exosome-Mediated

- EphA2 transfer in pancreatic cancer. *Theranostics* 8:5986–5994.
30. Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W. W., Comber, H., Forman, D., Bray, F. (2013) Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer* 49:1374–1403.
 31. Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O’Shea, K. S., Powell-Braxton, L., Hillan, K. J., Moore, M. W. (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380:439–442.
 32. Ferrara, N., Gerber, H. P., LeCouter, J. (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 9:669–676.
 33. Figlin, R. A. (1999) Renal cell carcinoma: Management of advanced disease. *Journal of Urology* 161:381–387.
 34. Fingar, D. C., Richardson, C. J., Tee, A. R., Cheatham, L., Tsou, C., Blenis, J. (2004) mTOR Controls Cell Cycle Progression through Its Cell Growth Effectors S6K1 and 4E-BP1/Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E. *Molecular and Cellular Biology* 24:200–216.
 35. Gardiner, C., Vizio, D. Di, Sahoo, S., Théry, C., Witwer, K. W., Wauben, M., Hill, A. F. (2016) Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: Results of a worldwide survey. *Journal of Extracellular Vesicles* 5:1–6.
 36. Gnarr, J. R., Tory, K., Weng, Y., Schmidt, L., Wei, M. H., Li, H., Latif, F., Liu, S., Chen, F., Duh, F.-M., Lubensky, I., Duan, D. R., Florence, C., Pozzatti, R., Walther, M. M., Bander, N. H., Grossman, H. B., Brauch, H., Pomer, S., ... Linehan, W. M. (1994) Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nature Genetics* 7:85–90.
 37. Gottesman, M. M., Fojo, T., Bates, S. E. (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer* 2:48–58.
 38. Greenberg, J. W., Kim, H., Moustafa, A. A., Datta, A., Barata, P. C., Boulares, A. H., Abdel-Mageed, A. B., Krane, L. S. (2021) Repurposing ketoconazole as an exosome directed adjunct to sunitinib in treating renal cell carcinoma. *Scientific Reports* 11:1–12.
 39. H. Rashed, M., Bayraktar, E., K. Helal, G., Abd-Allah, M. F., Amero, P., Chavez-Reyes, A., Rodriguez-Aguayo, C. (2017) Exosomes: From Garbage Bins to Promising

- Therapeutic Targets. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 3).
40. Haigh, J. J., Gerber, H. P., Ferrara, N., Wagner, E. F. (2000) Conditional inactivation of VEGF-A in areas of collagen2a1 expression results in embryonic lethality in the heterozygous state. *Development* 127:1445–1453.
 41. Hanson, P. I., Cashikar, A. (2012) Multivesicular Body Morphogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28:337–362.
 42. Heitman, J., Movva, N., Hall, M. (1991) Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253:905–909.
 43. Hemal, A. K., Kumar, A., Kumar, R., Wadhwa, P., Seth, A., Gupta, N. P. (2007) Laparoscopic Versus Open Radical Nephrectomy for Large Renal Tumors: A Long-Term Prospective Comparison. *Journal of Urology* 177:862–866.
 44. Heng, D. Y., Xie, W., Regan, M. M., Harshman, L. C., Bjarnason, G. A., Vaishampayan, U. N., Mackenzie, M., Wood, L., Donskov, F., Tan, M.-H., Rha, S.-Y., Agarwal, N., Kollmannsberger, C., Rini, B. I., Choueiri, T. K. (2013) External validation and comparison with other models of the International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium prognostic model: a population-based study. *The Lancet Oncology* 14:141–148.
 45. Henne, W. M., Buchkovich, N. J., Emr, S. D. (2011) The ESCRT Pathway. *Developmental Cell* 21:77–91.
 46. Himbert, D., Zeuschner, P., Ayoubian, H., Heinzemann, J., Stöckle, M., Junker, K. (2020) Characterization of cd147, ca9, and cd70 as tumor-specific markers on extracellular vesicles in clear cell renal cell carcinoma. *Diagnostics* 10:.
 47. Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplod, N., Uryu, K., Pharmed, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A. E., Ararso, Y., ... Lyden, D. (2015) Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527:329–335.
 48. Huang, H., Gao, Y., Liu, A., Yang, X., Huang, F., Xu, L., Danfeng, X., Chen, L. (2019) EIF3D promotes sunitinib resistance of renal cell carcinoma by interacting with GRP78 and inhibiting its degradation. *EBioMedicine* 49:189–201.
 49. Hudes, G., Carducci, M., Tomczak, P., Dutcher, J., Figlin, R., Kapoor, A., Staroslawska,

- E., Sosman, J., Mcdermott, D., Bodrogi, I., Kovacevic, Z., Lesovoy, V., Schmidt-Wolf, I. G. H., Barbarash, O., Gokmen, E., O'Toole, T., Lustgarten, S., Moore, L., Motzer, R. J. (2007) Temsirolimus, Interferon Alfa, or Both for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine* 356:2271–2281.
50. Hudes, G. R. (2009) Targeting mTOR in renal cell carcinoma. *Cancer* 115:2313–2320.
 51. Hudson, C. C., Liu, M., Chiang, G. G., Otterness, D. M., Loomis, D. C., Kaper, F., Giaccia, A. J., Abraham, R. T. (2002) Regulation of Hypoxia-Inducible Factor 1 α Expression and Function by the Mammalian Target of Rapamycin. *Molecular and Cellular Biology* 22:7004–7014.
 52. Hunt, J. D., Van Der Hel, O. L., McMillan, G. P., Boffetta, P., Brennan, P. (2005) Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: Meta-analysis of 24 studies. *International Journal of Cancer* 114:101–108.
 53. Huotari, J., Helenius, A. (2011) Endosome maturation. *The EMBO Journal* 30:3481–3500.
 54. Kamli, H., Glenda, G. C., Li, L., Vesey, D. A., Morais, C. (2018) Characterisation of the Morphological, Functional and Molecular Changes in Sunitinib-Resistant Renal Cell Carcinoma Cells. *Journal of Kidney Cancer and VHL* 5:1–9.
 55. Karami, S., Lan, Q., Rothman, N., Stewart, P. A., Lee, K. M., Vermeulen, R., Moore, L. E. (2012) Occupational trichloroethylene exposure and kidney cancer risk: A meta-analysis. *Occupational and Environmental Medicine* 69:858–867.
 56. Keisner, S. V., Shah, S. R. (2011) Pazopanib. *Drugs* 1.
 57. Khoja, L., Butler, M. O., Kang, S. P., Ebbinghaus, S., Joshua, A. M. (2015) Pembrolizumab. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 3:.
 58. Kim, H. L., Beldegrun, A. S., Freitas, D. G., Bui, M. H. T., Han, K. R., Dorey, F. J., Figlin, R. A. (2003) Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: Implications for prognosis. *Journal of Urology* 170:1742–1746.
 59. Kucharzewska, P., Christianson, H. C., Welch, J. E., Svensson, K. J., Fredlund, E., Ringner, M., Morgelin, M., Bourseau-Guilmain, E., Bengzon, J., Belting, M. (2013) Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:7312–7317.

60. Lane, B. R., Tiong, H. Y., Campbell, S. C., Fergany, A. F., Weight, C. J., Larson, B. T., Novick, A. C., Flechner, S. M. (2009) Management of the Adrenal Gland During Partial Nephrectomy. *Journal of Urology* 181:2430–2437.
61. Latif, F., Tory, K., Gnarr, J., Yao, M., Duh, F. M., Orcutt, M. Lou, Stackhouse, T., Kuzmin, I., Modi, W., Geil, L., Schmidt, L., Zhou, F., Li, H., Wei, M. H., Chen, F., Glenn, G., Choyke, P., Walther, M. M., Weng, Y., ... Lerman, M. I. (1993) Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 260:1317–1320.
62. Lee, J. L., Kim, M. K., Park, I., Ahn, J.-H., Lee, D. H., Ryoo, H. M., Song, C., Hong, B., Hong, J. H., Ahn, H. (2015) RandomizEd phase II trial of Sunitinib four weeks on and two weeks off versus Two weeks on and One week off in metastatic clear-cell type REnal cell carcinoma: RESTORE trial. *Annals of Oncology* 26:2300–2305.
63. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, A. (2023) *S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion* 1.2 AWMF Regis:1–219. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/043-017OI_I_S3_Nierenzellkarzinom_2017-04.pdf
64. Leonard, G. D., Fojo, T., Bates, S. E. (2003) The Role of ABC Transporters in Clinical Practice. *The Oncologist* 8:411–424.
65. Lim, A. R., Vincent, B. G., Weaver, A. M., Rathmell, W. K. (2021) Sunitinib and Axitinib increase secretion and glycolytic activity of small extracellular vesicles in renal cell carcinoma. *Cancer Gene Therapy*.
66. Linxweiler, J., Junker, K. (2020) Extracellular vesicles in urological malignancies: an update. *Nature Reviews Urology* 17:11–27.
67. Liu, Y., Cheng, G., Huang, Z., Bao, L., Liu, J., Wang, C., Xiong, Z., Zhou, L., Xu, T., Liu, D., Yang, H., Chen, K., Zhang, X. (2020) Long noncoding RNA SNHG12 promotes tumour progression and sunitinib resistance by upregulating CDCA3 in renal cell carcinoma. *Cell Death and Disease* 11:.
68. Ljungberg, B., Bensalah, K., Canfield, S., Dabestani, S., Hofmann, F., Hora, M., Kuczyk, M. A., Lam, T., Marconi, L., Merseburger, A. S., Mulders, P., Powles, T., Staehler, M., Volpe, A., Bex, A. (2021) EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2021 update. *European Urology* 67:913–924.
69. Lowrance, W. T., Ordoñez, J., Udaltsova, N., Russo, P., Go, A. S. (2014) CKD and the

- risk of incident cancer. *Journal of the American Society of Nephrology* 25:2327–2334.
70. Lu, C., Wei, Y., Wang, X., Zhang, Z., Yin, J., Li, W., Chen, L., Lyu, X., Shi, Z., Yan, W., You, Y. (2020) DNA-methylation-mediated activating of lncRNA SNHG12 promotes temozolomide resistance in glioblastoma. *Molecular Cancer* 19:1–19.
 71. Maher, E. R., Yates, J. R. W., Harries, R., Benjamin, C., Harris, R., Moore, A. T., Ferguson-Smith, M. A. (1990) Clinical Features and Natural History of von Hippel-Lindau Disease. *QJM* 77:1151–1163.
 72. Mao, W., Wang, K., Wu, Z., Xu, B., Chen, M. (2021) Current status of research on exosomes in general, and for the diagnosis and treatment of kidney cancer in particular. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 40:1–13.
 73. Marona, P., Górká, J., Kotlinowski, J., Majka, M., Jura, J., Miekus, K. (2019) C-Met as a Key Factor Responsible for Sustaining Undifferentiated Phenotype and Therapy Resistance in Renal Carcinomas. *Cells* 8:272.
 74. Mathivanan, S., Simpson, R. J. (2009) ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics* 9:4997–5000.
 75. Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. (2001) Activation of the HIF pathway in cancer. *Current Opinion in Genetics and Development* 11:293–299.
 76. Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G.-W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maher, E. R., Ratcliffe, P. J. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399:271–275.
 77. Meads, M. B., Gatenby, R. A., Dalton, W. S. (2009) Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nature Reviews Cancer* 9:665–674.
 78. Mendel, D. B., Douglas Laird, A., Xin, X., Louie, S. G., Christensen, J. G., Li, G., Schreck, R. E., Abrams, T. J., Ngai, T. J., Lee, L. B., Murray, L. J., Carver, J., Chan, E., Moss, K. G., Haznedar, J. Ö., Sukbuntherng, J., Blake, R. A., Sun, L., Tang, C., ... Cherrington, J. M. (2003) In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: Determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clinical Cancer Research* 9:327–337.

79. Meric-Bernstam, F., Gonzalez-Angulo, A. M. (2009) Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology* 27:2278–2287.
80. Moch, H., Amin, M. B., Berney, D. M., Comp erat, E. M., Gill, A. J., Hartmann, A., Menon, S., Raspollini, M. R., Rubin, M. A., Srigley, J. R., Hoon Tan, P., Tickoo, S. K., Tsuzuki, T., Turajlic, S., Cree, I., Netto, G. J. (2022) The 2022 World Health Organization Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *European Urology* 82:458–468.
81. Moitra, K., Lou, H., Dean, M. (2011) Multidrug Efflux Pumps and Cancer Stem Cells: Insights Into Multidrug Resistance and Therapeutic Development. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 89:491–502.
82. Moore, L. E., Jaeger, E., Nickerson, M. L., Brennan, P., De Vries, S., Roy, R., Toro, J., Li, H., Karami, S., Lenz, P., Zaridze, D., Janout, V., Bencko, V., Navratilova, M., Szeszenia-Dabrowska, N., Mates, D., Linehan, W. M., Merino, M., Simko, J., ... Waldman, F. M. (2012) Genomic copy number alterations in clear cell renal carcinoma: Associations with case characteristics and mechanisms of VHL gene inactivation. *Oncogenesis* 1:1–9.
83. Motzer, R. J., Agarwal, N., Beard, C., Bolger, G. B., Boston, B., Carducci, M. A., Choueiri, T. K., Figlin, R. A., Fishman, M., Hancock, S. L., Hudes, G. R., Jonasch, E., Kessinger, A., Kuzel, T. M., Lange, P. H., Levine, E. G., Margolin, K. A., Michaelson, M. D., Olencki, T., ... Wang, J. (2009) Kidney Cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 7:618–630.
84. Motzer, R. J., Hoosen, S., Bello, C. L., Christensen, J. G. (2006) Sunitinib malate for the treatment of solid tumours: a review of current clinical data. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 15:553–561.
85. Motzer, R. J., Hutson, T. E., Cella, D., Reeves, J., Hawkins, R., Guo, J., Nathan, P., Staehler, M., de Souza, P., Merchan, J. R., Boleti, E., Fife, K., Jin, J., Jones, R., Uemura, H., De Giorgi, U., Harmenberg, U., Wang, J., Sternberg, C. N., ... Choueiri, T. K. (2013) Pazopanib versus Sunitinib in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine* 369:722–731.
86. Motzer, R. J., Hutson, T. E., Tomczak, P., Michaelson, M. D., Bukowski, R. M., Oudard, S., Negrier, S., Szczylik, C., Pili, R., Bjarnason, G. A., Garcia-del-Muro, X., Sosman, J. A., Solska, E., Wilding, G., Thompson, J. A., Kim, S. T., Chen, I., Huang, X., Figlin, R. A. (2009) Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon

- alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 27:3584–3590.
87. Motzer, R. J., Hutson, T. E., Tomczak, P., Michaelson, M. D., Bukowski, R. M., Rixe, O., Oudard, S., Negrier, S., Szczylik, C., Kim, S. T., Chen, I., Bycott, P. W., Baum, C. M., Figlin, R. A. (2007) Sunitinib versus Interferon Alfa in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine* 356:115–124.
 88. Motzer, R. J., Mazumdar, M., Bacik, J., Russo, P., Berg, W. J., Metz, E. M. (2000) Effect of Cytokine Therapy on Survival for Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 18:1928–1935.
 89. Motzer, R. J., Tannir, N. M., McDermott, D. F., Arén Frontera, O., Melichar, B., Choueiri, T. K., Plimack, E. R., Barthélémy, P., Porta, C., George, S., Powles, T., Donskov, F., Neiman, V., Kollmannsberger, C. K., Salman, P., Gurney, H., Hawkins, R., Ravaud, A., Grimm, M.-O., ... Escudier, B. (2018) Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine* 378:1277–1290.
 90. Muglia, V. F., Prando, A. (2015) Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiologia Brasileira* 48:166–174.
 91. Novara, G., Ficarra, V., Antonelli, A., Artibani, W., Bertini, R., Carini, M., Cosciani Cunico, S., Imbimbo, C., Longo, N., Martignoni, G., Martorana, G., Minervini, A., Mirone, V., Montorsi, F., Schiavina, R., Simeone, C., Serni, S., Simonato, A., Siracusano, S., ... Strada, E. (2010) Validation of the 2009 TNM version in a large multi-institutional cohort of patients treated for renal cell carcinoma: Are further improvements needed? *European Urology* 58:588–595.
 92. Noy, R., Jeffrey (2014) Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity* 41:49–61.
 93. Padala, S. A., Barsouk, A., Thandra, K. C., Saginala, K., Mohammed, A., Vakiti, A., Rawla, P., Barsouk, A. (2020) Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *World Journal of Oncology* 11:79–87.
 94. Pal, S. K., Quinn, D. I. (2013) Differentiating mTOR inhibitors in renal cell carcinoma. *Cancer Treatment Reviews* 39:709–719.
 95. Palapattu, G. S., Kristo, B., Rajfer, J. (2002) Paraneoplastic syndromes in urologic malignancy: the many faces of renal cell carcinoma. *Reviews in Urology* 4:163–170. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16985675> <http://www.pubmedcentral.nih.gov>

96. Pantuck, A. J., Seligson, D. B., Klatte, T., Yu, H., Leppert, J. T., Moore, L., O'Toole, T., Gibbons, J., Belldegrun, A. S., Figlin, R. A. (2007) Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma: Implications for molecular patient selection for targeted therapy. *Cancer* 109:2257–2267.
97. Park, J. E., Tan, H. Sen, Datta, A., Lai, R. C., Zhang, H., Meng, W., Lim, S. K., Sze, S. K. (2010) Hypoxic Tumor Cell Modulates Its Microenvironment to Enhance Angiogenic and Metastatic Potential by Secretion of Proteins and Exosomes. *Molecular & Cellular Proteomics* 9:1085–1099.
98. Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., De Milito, A., Coscia, C., Iessi, E., Logozzi, M., Molinari, A., Colone, M., Tatti, M., Sargiacomo, M., Fais, S. (2009) Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *Journal of Biological Chemistry* 284:34211–34222.
99. Patel, G. K., Khan, M. A., Zubair, H., Srivastava, S. K., Khushman, M., Singh, S., Singh, A. P. (2019) Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. *Scientific Reports* 9:1–10.
100. Patel, S. P., Kurzrock, R. (2015) PD-L1 expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy. *Molecular Cancer Therapeutics* 14:847–856.
101. Patil, A. A., Rhee, W. J. (2019) Exosomes: Biogenesis, Composition, Functions, and Their Role in Pre-metastatic Niche Formation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 24:689–701.
102. Pavlovich, C. P., Schmidt, L. S. (2004) Searching for the hereditary causes of renal-cell carcinoma. *Nature Reviews Cancer* 4:381–393.
103. Pavlovich, C. P., Walther, M. M., Eyler, R. A., Hewitt, S. M., Zbar, B., Linehan, W. M., Merino, M. J. (2002) Renal Tumors in the Birt-Hogg-Dubé Syndrome. *The American Journal of Surgical Pathology* 26: https://journals.lww.com/ajsp/Fulltext/2002/12000/Renal_Tumors_in_the_Birt_Hogg_Dub_Syndrome.2.aspx
104. Pedrosa, I., Sun, M. R., Spencer, M., Genega, E. M., Olumi, A. F., Dewolf, W. C., Rofsky, N. M. (2008) MR Imaging of Renal Masses: Correlation with Findings at Surgery and Pathologic Analysis. *RadioGraphics* 28:985–1003.

105. Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C. M., Nitadori-Hoshino, A., Hoffman, C., Badal, K., Garcia, B. A., Callahan, M. K., Yuan, J., Martins, V. R., Skog, J., Kaplan, R. N., ... Lyden, D. (2012) Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature Medicine* 18:883–891.
106. Piper, R. C., Lehner, P. J. (2011) Endosomal transport via ubiquitination. *Trends in Cell Biology* 21:647–655.
107. Pischon, T., Lahmann, P. H., Boeing, H., Tjønneland, A., Halkjær, J., Overvad, K., Klipstein-Grobusch, K., Linseisen, J., Becker, N., Trichopoulou, A., Benetou, V., Trichopoulos, D., Sieri, S., Palli, D., Tumino, R., Vineis, P., Panico, S., Monninkhof, E., Peeters, P. H. M., ... Riboli, E. (2006) Body size and risk of renal cell carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *International Journal of Cancer* 118:728–738.
108. Prasad, S. R., Humphrey, P. A., Catena, J. R., Narra, V. R., Srigley, J. R., Cortez, A. D., Dalrymple, N. C., Chintapalli, K. N. (2006) Common and Uncommon Histologic Subtypes of Renal Cell Carcinoma: Imaging Spectrum with Pathologic Correlation. *RadioGraphics* 26:1795–1806.
109. Prior, C., Perez-Gracia, J. L., Garcia-Donas, J., Rodriguez-Antona, C., Guruceaga, E., Esteban, E., Suarez, C., Castellano, D., Alba, A. G. del, Lozano, M. D., Carles, J., Climent, M. A., Arranz, J. A., Gallardo, E., Puente, J., Bellmunt, J., Gurrpide, A., Lopez-Picazo, J. M., Hernandez, A. G., ... Calvo, A. (2014) Identification of Tissue microRNAs Predictive of Sunitinib Activity in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *PLOS ONE* 9:e86263. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086263>
110. Qu, L., Ding, J., Chen, C., Wu, Z. J., Liu, B., Gao, Y., Chen, W., Liu, F., Sun, W., Li, X. F., Wang, X., Wang, Y., Xu, Z. Y., Gao, L., Yang, Q., Xu, B., Li, Y. M., Fang, Z. Y., Xu, Z. P., ... Wang, L. H. (2016) Exosome-Transmitted IncARSR Promotes Sunitinib Resistance in Renal Cancer by Acting as a Competing Endogenous RNA. *Cancer Cell* 29:653–668.
111. Ringuette Goulet, C., Bernard, G., Tremblay, S., Chabaud, S., Bolduc, S., Pouliot, F. (2018) Exosomes Induce Fibroblast Differentiation into Cancer-Associated Fibroblasts through TGFβ Signaling. *Molecular Cancer Research* 16:1196–1204.
112. Rini, B. I., Atkins, M. B. (2009) Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma.

The Lancet Oncology 10:992–1000.

113. Rini, B. I., Escudier, B., Tomczak, P., Kaprin, A., Szczylik, C., Hutson, T. E., Michaelson, M. D., Gorbunova, V. A., Gore, M. E., Rusakov, I. G., Negrier, S., Ou, Y. C., Castellano, D., Lim, H. Y., Uemura, H., Tarazi, J., Cella, D., Chen, C., Rosbrook, B., ... Motzer, R. J. (2011) Comparative effectiveness of axitinib versus sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): A randomised phase 3 trial. *The Lancet* 378:1931–1939.
114. Rini, B. I., Halabi, S., Rosenberg, J. E., Stadler, W. M., Vaena, D. A., Ou, S. S., Archer, L., Atkins, J. N., Picus, J., Czaykowski, P., Dutcher, J., Small, E. J. (2008) Bevacizumab plus interferon alfa compared with interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: CALGB 90206. *Journal of Clinical Oncology* 26:5422–5428.
115. Rini, B. I., Plimack, E. R., Stus, V., Gafanov, R., Hawkins, R., Nosov, D., Pouliot, F., Alekseev, B., Soulières, D., Melichar, B., Vynnychenko, I., Kryzhanivska, A., Bondarenko, I., Azevedo, S. J., Borchiellini, D., Szczylik, C., Markus, M., McDermott, R. S., Bedke, J., ... Powles, T. (2019) Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine* 380:1116–1127.
116. Rini, B. I., Small, E. J. (2005) Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 23:1028–1043.
117. Ruan, H. L., Li, X., Yang, H. M., Song, Z. S., Tong, J. W., Cao, Q., Wang, K. S., Xiao, W., Xiao, H. Bin, Chen, X. Y., Xu, G. H., Bao, L., Xiong, Z. Y., Yuan, C. F., Liu, L., Qu, Y., Hu, W. J., Gao, Y. Y., Ru, Z. Y., ... Zhang, X. P. (2017) Enhanced expression of caveolin-1 possesses diagnostic and prognostic value and promotes cell migration, invasion and sunitinib resistance in the clear cell renal cell carcinoma. *Experimental Cell Research* 358:269–278.
118. Sabers, C. J., Martin, M. M., Brunn, G. J., Williams, J. M., Dumont, F. J., Wiederrecht, G., Abraham, R. T. (1995) Isolation of a Protein Target of the FKBP12-Rapamycin Complex in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry* 270:815–822.
119. Santos, J. C., Lima, N. D. S., Sarian, L. O., Matheu, A., Ribeiro, M. L., Derchain, S. F. M. (2018) Exosome-mediated breast cancer chemoresistance via miR-155 transfer. *Scientific Reports* 8.

120. Sato-Kuwabara, Y., Melo, S. A., Soares, F. A., Calin, G. A. (2015) The fusion of two worlds: Non-coding RNAs and extracellular vesicles - diagnostic and therapeutic implications (Review). *International Journal of Oncology* 46:17–27.
121. Sato, Y., Yoshizato, T., Shiraishi, Y., Maekawa, S., Okuno, Y., Kamura, T., Shimamura, T., Sato-Otsubo, A., Nagae, G., Suzuki, H., Nagata, Y., Yoshida, K., Kon, A., Suzuki, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Niida, A., Fujimoto, A., Tsunoda, T., ... Ogawa, S. (2013) Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nature Genetics* 45:860–867.
122. Scelo, G., Larose, T. L. (2018) Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Journal of Clinical Oncology* 36:3574–3581.
123. Semenza, G. L. (2011) Oxygen Sensing, Homeostasis, and Disease. *New England Journal of Medicine* 365:537–547.
124. Shen, C., Kaelin, W. G. (2013) The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma. *Seminars in Cancer Biology* 23:18–25.
125. Simhadri, V. R., Reiners, K. S., Hansen, H. P., Topolar, D., Simhadri, V. L., Nohroudi, K., Kufer, T. A., Engert, A., Pogge von Strandmann, E. (2008) Dendritic Cells Release HLA-B-Associated Transcript-3 Positive Exosomes to Regulate Natural Killer Function. *PLOS ONE* 3:e3377. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003377>
126. Sondak, V. K., Smalley, K. S. M., Kudchadkar, R., Gripon, S., Kirkpatrick, P. (2011) Ipilimumab. *Nature Reviews Drug Discovery* 10:411–412.
127. Soo, C. Y., Song, Y., Zheng, Y., Campbell, E. C., Riches, A. C., Gunn-Moore, F., Powis, S. J. (2012) Nanoparticle tracking analysis monitors microvesicle and exosome secretion from immune cells. *Immunology* 136:192–197.
128. Steinbichler, T. B., Dudás, J., Skvortsov, S., Ganswindt, U., Riechelmann, H., Skvortsova, I. I. (2019) Therapy resistance mediated by exosomes. *Molecular Cancer* 18:1–11.
129. Sternberg, C. N., Davis, I. D., Mardiak, J., Szczylik, C., Lee, E., Wagstaff, J., Barrios, C. H., Salman, P., Gladkov, O. A., Kavina, A., Zarbá, J. J., Chen, M., McCann, L., Pandite, L., Roychowdhury, D. F., Hawkins, R. E. (2010) Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: Results of a randomized phase III trial. *Journal of Clinical Oncology* 28:1061–1068.

130. Störkel, S., Eble, J. N., Adlakha, K., Amin, M., Blute, M. L., Bostwick, D. G., Darson, M., Delahunt, B., Iczkowski, K. (1997) Classification of renal cell carcinoma. *Cancer* 80:987–989.
131. Takov, K., Yellon, D. M., Davidson, S. M. (2017) Confounding factors in vesicle uptake studies using fluorescent lipophilic membrane dyes. *Journal of Extracellular Vesicles* 6:1–15.
132. Tamang, S., Acharya, V., Roy, D., Sharma, R., Aryaa, A., Sharma, U., Khandelwal, A., Prakash, H., Vasquez, K. M., Jain, A. (2019) SNHG12: An LncRNA as a Potential Therapeutic Target and Biomarker for Human Cancer. *Frontiers in Oncology* 9:1–12.
133. Tamaskar, I., Choueiri, T. K., Sercia, L., Rini, B., Bukowski, R., Zhou, M. (2007) Differential expression of caveolin-1 in renal neoplasms. *Cancer* 110:776–782.
134. Tang, Y. T., Huang, Y. Y., Zheng, L., Qin, S. H., Xu, X. P., An, T. X., Xu, Y., Wu, Y. S., Hu, X. M., Ping, B. H., Wang, Q. (2017) Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum. *International Journal of Molecular Medicine* 40:834–844.
135. Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. K. (2018) Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles* 7:.
136. Thompson, R. H., Kuntz, S. M., Leibovich, B. C., Dong, H., Lohse, C. M., Webster, W. S., Sengupta, S., Frank, I., Parker, A. S., Zincke, H., Blute, M. L., Sebo, T. J., Chevillet, J. C., Kwon, E. D. (2006) Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Research* 66:3381–3385.
137. Ting Tse, E. Y., Fat Ko, F. C., Kwan Tung, E. K., Chan, L. K., Wah Lee, T. K., Wai Ngan, E. S., Man, K., Tsai Wong, A. S., Ng, I. O.-L., Ping Yam, J. W. (2012) Caveolin-1 overexpression is associated with hepatocellular carcinoma tumorigenesis and metastasis. *The Journal of Pathology* 226:645–653.
138. Tkach, M., Théry, C. (2016) Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* 164:1226–1232.

139. Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brugger, B., Simons, M. (2008) Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science* 319:1244–1247.
140. Tsuruda, M., Yoshino, H., Okamura, S., Kuroshima, K., Osako, Y., Sakaguchi, T., Sugita, S., Tatarano, S., Nakagawa, M., Enokida, H. (2020) Oncogenic effects of RAB27B through exosome independent function in renal cell carcinoma including sunitinib-resistant. *PLoS ONE*.
141. Umezu, T., Imanishi, S., Azuma, K., Kobayashi, C., Yoshizawa, S., Ohyashiki, K., Ohyashiki, J. H. (2017) Replenishing exosomes from older bone marrow stromal cells with miR-340 inhibits myeloma-related angiogenesis. *Blood Advances* 1:812–823.
142. Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., Lötvall, J. O. (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology* 9:654–659.
143. van der Pol, E., Böing, A. N., Harrison, P., Sturk, A., Nieuwland, R. (2012) Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological Reviews* 64:676–705.
144. Vera-Badillo, F. E., Templeton, A. J., Duran, I., Ocana, A., De Gouveia, P., Aneja, P., Knox, J. J., Tannock, I. F., Escudier, B., Amir, E. (2015) Systemic therapy for non-clear cell renal cell carcinomas: A systematic review and meta-analysis. *European Urology* 67:740–749.
145. Vogelzang, N. J., Stadler, W. M. (1998) Kidney cancer. *The Lancet* 352:1691–1696.
146. Walunas, T. L., Bakker, C. Y., Bluestone, J. A. (1996) CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *Journal of Experimental Medicine* 183:2541–2550.
147. Wang, O. C., Yang, F., Liu, Y. H., Lv, L., Ma, R., Chen, C., Wang, J., Tan, Q., Cheng, Y., Xia, E., Chen, Y., Zhang, X. H. (2017) C-MYC-induced upregulation of lncRNA SNHG12 regulates cell proliferation, apoptosis and migration in triple-negative breast cancer. *American Journal of Translational Research* 9:533–545.
148. Wang, Z., Chang, X., Zhu, G., Gao, X., Chang, L. (2020) Depletion of lncRNA MALAT1 inhibited sunitinib resistance through regulating miR-362-3p-mediated G3BP1 in renal cell carcinoma. *Cell Cycle* 19:2054–2062.
149. Weikert, S., Boeing, H., Pischon, T., Weikert, C., Olsen, A., Tjønneland, A., Overvad,

- K., Becker, N., Linseisen, J., Trichopoulou, A., Mountokalakis, T., Trichopoulos, D., Sieri, S., Palli, D., Vineis, P., Panico, S., Peeters, P. H. M., Bueno-De-Mesquita, H. B., Verschuren, W. M. M., ... Riboli, E. (2008) Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *American Journal of Epidemiology* 167:438–446.
150. Whiteside, T. L. (2016) Exosomes and tumor-mediated immune suppression. *Journal of Clinical Investigation* 126:1216–1223.
151. Wiszniak, S., Schwarz, Q. (2021) Exploring the intracrine functions of vegf-a. *Biomolecules* 11:1–13.
152. XIAO, H., SHI, J. (2020) Exosomal circular RNA-400068 promotes the development of renal cell carcinoma via the miR-210-5p/SOCS1 axis. *Molecular Medicine Reports* 22:4810–4820.
153. Yakes, F. M., Chen, J., Tan, J., Yamaguchi, K., Shi, Y., Yu, P., Qian, F., Chu, F., Bentzien, F., Cancilla, B., Orf, J., You, A., Laird, A. D., Engst, S., Lee, L., Lesch, J., Chou, Y. C., Joly, A. H. (2011) Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth. *Molecular Cancer Therapeutics* 10:2298–2308.
154. Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R. M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-Da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., ... De Wever, O. (2015) Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles* 4:1–60.
155. Yuan, G., Regel, I., Lian, F., Friedrich, T., Hitkova, I., Hofheinz, R. D., Ströbel, P., Langer, R., Keller, G., Röcken, C., Zimmermann, W., Schmid, R. M., Ebert, M. P. A., Burgermeister, E. (2013) WNT6 is a novel target gene of caveolin-1 promoting chemoresistance to epirubicin in human gastric cancer cells. *Oncogene* 32:375–387.
156. Zbar, B., Brauch, H., Talmadge, C., Linehan, M. (1987) Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. *Nature* 327:721–724.
157. Zeng, Z., Li, Y., Pan, Y., Lan, X., Song, F., Sun, J., Zhou, K., Liu, X., Ren, X., Wang, F., Hu, J., Zhu, X., Yang, W., Liao, W., Li, G., Ding, Y., Liang, L. (2018) Cancer-derived exosomal miR-25-3p promotes pre-metastatic niche formation by inducing vascular permeability and angiogenesis. *Nature Communications* 9:.

158. Zhang, H., Lu, W. (2018) LncRNA SNHG12 regulates gastric cancer progression by acting as a molecular sponge of miR-320. *Molecular Medicine Reports* 17:2743–2749.
159. Zhang, W., Zheng, X., Yu, Y., Zheng, L., Lan, J., Wu, Y., Liu, H., Zhao, A. (2022) Renal cell carcinoma-derived exosomes deliver IncARSR to induce macrophage polarization and promote tumor progression via STAT3 pathway 18:.
160. Zhang, Y., Bi, J., Huang, J., Tang, Y., Du, S., Li, P. (2020) Exosome: A review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications. *International Journal of Nanomedicine* 15:6917–6934.
161. Zhang, Y., Wang, X.-F. (2015) A niche role for cancer exosomes in metastasis. *Nature Cell Biology* 17:709–711.
162. Zheng, X.-F., Fiorentino, D., Chen, J., Crabtree, G. R., Schreiber, S. L. (1995) TOR kinase domains are required for two distinct functions, only one of which is inhibited by rapamycin. *Cell* 82:121–130.
163. Zhou, L., Liu, X. D., Sun, M., Zhang, X., German, P., Bai, S., Ding, Z., Tannir, N., Wood, C. G., Matin, S. F., Karam, J. A., Tamboli, P., Sircar, K., Rao, P., Rankin, E. B., Laird, D. A., Hoang, A. G., Walker, C. L., Giaccia, A. J., Jonasch, E. (2016) Targeting MET and AXL overcomes resistance to sunitinib therapy in renal cell carcinoma. *Oncogene* 35:2687–2697.
164. Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Amigorena, S. (1998) Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: Dendritic cell-derived exosomes. *Nature Medicine* 4:594–600.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Kerstin Junker bedanken, welche mich bei der Durchführung dieser Arbeit jederzeit und mit allen Mitteln unterstützte. Vielen herzlichen Dank auch an meine Betreuerin Dr. Angela Zaccagnino für die hervorragende Betreuung. Desweiteren möchte ich mich bei Dirk Himbert für die Einweihung in die Künste der Ultrazentrifugation bedanken. Helga Angeli danke ich für die Einarbeitung in die Zellkultur.

Weiterer Dank gilt meinen Freunden und Familie für die großartige Unterstützung in den letzten Jahren.

9. Anhang

9.1 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Promotion: 10.06.2024

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. med Kirsten Junker

Prof. Dr. med Lorenz Thurner