

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

**Rolle von extrazellulären Vesikeln für die Resistenzinduktion in Nierenzellkarzinomen  
unter Behandlung mit Pazopanib**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

vorgelegt von Helen Klonig  
geb. am 19.01.1998  
in Dahn

Tag der Promotion: 05.11.2024

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Kerstin Junker

Prof. Dr. med. Lorenz Thurner

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>6</b>
<b>2. EINLEITUNG</b> .....	<b>8</b>
2.1 KLARZELLIGES NIERENZELLKARZINOM .....	8
2.1.1 Epidemiologie .....	8
2.1.2 Risikofaktoren .....	9
2.1.3 Histopathologische Einteilung nach WHO .....	9
2.1.4 Einteilung des Tumorstadiums .....	11
2.1.5 Symptomatik .....	13
2.1.6 Diagnostik .....	14
2.1.7 Prognose .....	14
2.1.8 Therapie .....	16
2.1.8.1 Therapie des nicht-metastasierten Nierenzellkarzinoms .....	16
2.1.8.2. Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms .....	17
2.1.8.3 Zugrundeliegende molekulare Mechanismen der systemischen Therapie .....	18
2.1.8.4 Wirkungsweise der systemischen Therapie .....	21
2.1.8.5 Therapieschemata .....	23
2.1.9 Spezifische Wirkung von Pazopanib .....	25
2.1.10 Entwicklung einer Therapieresistenz unter Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren .....	26
2.2 EXTRAZELLULÄRE VESIKEL .....	28
2.2.1 Aufbau und Synthese von extrazellulären Vesikeln .....	28
2.2.2 Funktionen von extrazellulären Vesikeln .....	31
2.2.3 Rolle von extrazellulären Vesikeln bei der Entwicklung einer Therapieresistenz .....	32
<b>3. ZIELSTELLUNG</b> .....	<b>34</b>
<b>4. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>35</b>
4.1 MATERIAL .....	35
4.1.1 Lösungen und Medien für die Zellkultur .....	35
4.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	36
4.1.3 SDS-Page und Immunoblotting .....	37
4.1.4 Antikörper .....	37
4.1.5 Allgemeine Puffer und Lösungen .....	38
4.1.6 Fluoreszenzmarkierung von Exosomen .....	39
4.1.7 Geräte .....	39
4.2 METHODEN .....	40
4.2.1. ALLGEMEINE ZELLKULTURMETHODEN .....	41
4.2.1.1 Zelllinie .....	41
4.2.1.2 Etablierung der Pazopanib-resistenten Zellen .....	41
4.2.1.3 Subkultivieren adhärenter Zellen in der Zellkultur .....	42
4.2.1.4 Kryokonservierung adhärenter Zellen .....	43

4.2.1.5 Auftauen adhärenter Zellen.....	43
4.2.1.6 Zellzählung.....	44
4.2.1.7 WST-1-Assay.....	44
4.2.1.8 Etablierung der LC-50.....	45
4.2.2. EXOSOMENISOLATION.....	48
4.2.2.1 Zellkultur.....	48
4.2.2.2 Herstellung des Exosomen-depletierten fetalen Kälberserums (FCS).....	48
4.2.2.3 Differentielle Zentrifugation.....	48
4.2.2.4 Ultrazentrifugation.....	49
4.2.3. EXOSOMENCHARAKTERISIERUNG.....	49
4.2.3.1 Vorbereitung der Proben.....	50
4.2.3.2 SDS-PAGE.....	51
4.2.3.3 Immunoblotting.....	51
4.2.3.4 Antikörperdetektion.....	52
4.2.4. NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS (NTA).....	54
4.2.5. ÜBERPRÜFUNG DER RESISTENZÜBERTRAGUNG.....	54
4.2.6. AUFNAHME FLUORESCENZMARKIERTER EXOSOMEN.....	56
4.2.6.1 Aussäen der Zellen.....	56
4.2.6.2 PKH26-Markierung von Exosomen.....	57
4.2.6.3 Fixierung der Zellen und Phalloidin-Färbung.....	58
4.2.6.4 Detektion.....	59
<b>5. ERGEBNISSE.....</b>	<b>60</b>
5.1 ETABLIERUNG DER ZELLZAHLEN.....	60
5.2 ÜBERPRÜFUNG DER RESISTENZ GEGEN PAZOPANIB IN DER ZELLINIE 786-O NACH LANGZEITBEHANDLUNG.....	62
5.2.1 Zellviabilitätswerte von 786-O <sup>PR</sup> im Vergleich zu 786-O <sup>WT</sup> bei steigenden Pazopanib-Konzentrationen.....	62
5.2.2 IC <sub>50</sub> von 786-O <sup>PR</sup> im Vergleich zu 786-O <sup>WT</sup> .....	65
5.3 ISOLATION UND CHARAKTERISIERUNG DER EXOSOMEN.....	72
5.3.1 Nanoparticle tracking analysis (NTA).....	72
5.3.2 Immunoblot.....	75
5.4 NACHWEIS DER AUFNAHME VON EXOSOMEN PAZOPANIB-RESISTENTER 786-O-ZELLEN IN SENSITIVE 786-O-ZELLEN.....	76
5.5 ANALYSE DER EFFEKTE DER EXOSOMEN RESISTENTER 786-O-ZELLEN AUF DIE ZELLVIABILITÄT SENSITIVER ZELLEN.....	77
<b>6. DISKUSSION.....</b>	<b>82</b>
6.1 METHODISCHE OPTIMIERUNG DER VERSUCHSABLÄUFE.....	82
6.2 BESTÄTIGUNG DER RESISTENZ GEGEN PAZOPANIB IN DER ZELLINIE 786-O NACH LANGZEITBEHANDLUNG.....	84

6.3 ISOLATION UND CHARAKTERISIERUNG DER EXOSOMEN PAZOPANIB-SENSITIVER UND PAZOPANIB-RESISTENTER 786-O-ZELLEN .....	86
6.4 NACHWEIS DER AUFNAHME VON EXOSOMEN RESISTENTER 786-O-ZELLEN IN SENSITIVE ZELLEN .....	89
6.5 ANALYSE DER EFFEKTE DER EXOSOMEN AUF DIE ZELLVIABILITÄT .....	91
<b>7. SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK .....</b>	<b>95</b>
<b>8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>96</b>
<b>9. TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>100</b>
<b>10. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>101</b>
<b>11. DANKSAGUNG .....</b>	<b>118</b>
<b>12. LEBENS LAUF .....</b>	<b>119</b>

# 1. Zusammenfassung

Maligne Nierentumoren sind in Deutschland unter den zehn häufigsten Tumorentitäten zu finden [53]. Da Patienten mit Fernmetastasen nach durchschnittlich 6 bis 15 Monaten eine Resistenz gegen Tyrosinkinaseinhibitoren als Bestandteil der systemischen Therapie entwickeln, ist es von großem Interesse, die Mechanismen der Resistenzentwicklung zu verstehen [143]. Zellen kommunizieren über kleine extrazelluläre Vesikel, sog. Exosomen, miteinander und können so DNA, RNA, Lipide, Proteine und Kohlenhydrate austauschen [79,178].

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Exosomen eine Resistenz gegen den Tyrosinkinaseinhibitor Pazopanib übertragen können. Die verwendete Pazopanib-resistente Zelllinie 786-O<sup>PR</sup> weist bei ansteigender Pazopanibkonzentration (7 – 22 µM) dauerhaft eine höhere Zellviabilität als die sensitive Zelllinie 786-O<sup>WT</sup> auf und zeigt eine deutlich erhöhte IC50. Sowohl die Exosomen von 786-O<sup>WT</sup> als auch die Exosomen von 786-O<sup>PR</sup> exprimieren in Immunoblot-Analysen CD63 und Syntenin als exosomale Marker. In NTA-Messungen weisen die Exosomen eine durchschnittliche Größe zwischen 115 und 132 nm auf, insgesamt sezernieren 786-O<sup>PR</sup>-Zellen mehr Exosomen als 786-O<sup>WT</sup>. Fluoreszenzgefärbte Exosomen von 786-O<sup>PR</sup> werden in sensitive 786-O<sup>WT</sup>-Zellen aufgenommen.

Durch die Stimulation von sensitiven Zellen mit Exosomen von 786-O<sup>PR</sup> kann die Zellviabilität unter Behandlung mit Pazopanib von 17,9% (PBS-Kontrolle) auf maximal 33,5% (8 µg/ml 786-O<sup>PR</sup>-Exosomen) gesteigert werden ( $p = 0,995$ ). Die Erhöhung der Zellviabilität kann auch durch Stimulation der Zellen mit Exosomen von 786-O<sup>WT</sup> erreicht werden, der Effekt ist allerdings weniger stark ausgeprägt (maximal 20,3% nach Stimulation mit 8 µg/ml 786-O<sup>WT</sup>-Exosomen,  $p = 1,0$ ). Eine Stimulation mit 786-O<sup>PR</sup>-Exosomen resultiert in einer generellen Steigerung der Zellviabilität von 100% (PBS-Kontrolle) auf maximal 159,8% (8 µg/ml 786-O<sup>PR</sup>-Exosomen) unter Behandlung mit DMSO ( $p = 0,026$ ).

786-O<sup>PR</sup>-Zellen zeigen eine verstärkte Expression von Axl/c-MET im Vergleich zu den sensitiven Zellen als Hinweis auf eine mögliche Hochregulation eines alternativen Pathways zur Zellproliferation.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sensitive 786-O-Zellen durch Stimulation mit Exosomen resistenter 786-O-Zellen eine höhere Toleranz gegen eine Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Pazopanib aufweisen. Um die beobachteten Effekte auf das Zellüberleben in kausalem Zusammenhang mit einer Exosomenstimulation bringen zu können, müssen sich weitere Experimente anschließen. Eine genauere Charakterisierung des Inhalts der Exosomen sensitiver und resistenter 786-O-Zellen kann zur Klärung der Resistenzentwicklung beitragen. Da es zahlreiche zelluläre Pathways zur Zellproliferation und zum Zellüberleben gibt, ist die Entdeckung eines singulären Übertragungsmechanismus

unwahrscheinlich. Vielmehr ist eine Kombination aus mehreren molekularen Mechanismen denkbar, wobei nicht nur Exosomen eine Rolle spielen.

Renal malignancies are to be found amongst the ten most prevalent cancers in Germany [53]. As patients treated with systemic therapy usually develop resistances against the widely used tyrosine kinase inhibitors after about 6 to 15 months of treatment, it is of great interest to further investigate the mechanisms behind developing resistances against targeted therapy [143]. Exosomes as means of intercellular communication serve to exchange DNA, RNA, lipids, proteins and carbohydrates between cells [79,178]. This doctoral thesis sought to explore whether or not exosomes could transfer a resistance against the tyrosine kinase inhibitor Pazopanib.

786-O<sup>PR</sup> (Pazopanib-resistant ccRCC-cells) constantly display a higher cell viability while being exposed to rising concentrations of Pazopanib (7 – 22  $\mu$ M) in comparison to Pazopanib-sensitive 786-O<sup>WT</sup> cells and also present to have a higher IC<sub>50</sub>.

Exosomes of both 786-O<sup>WT</sup> and 786-O<sup>PR</sup> express exosomal markers such as CD63 and Syntenin in western blot analysis. Nanoparticle tracking analysis showed the average size of exosomes to be ranging between 115 and 132 nm. In addition to that, 786-O<sup>PR</sup> produces far more exosomes than 786-O<sup>WT</sup>. The stimulation of sensitive 786-O<sup>WT</sup> cells with 8  $\mu$ g/ml exosomes derived from 786-O<sup>PR</sup> leads to an increase in cell viability from 17.9% up to 33.5% when cells are treated with Pazopanib after stimulation ( $p = 0.995$ ). Slight increases in cell viability can also be achieved by stimulating 786-O<sup>WT</sup> cells with their own exosomes, even though the effect is not as strong with a maximum of 20.3% cell viability after stimulation with 8  $\mu$ g/ml 786-O<sup>WT</sup> exosomes ( $p = 1.0$ ). If cells are treated with DMSO, stimulation of 786-O<sup>WT</sup> cells with exosomes derived from 786-O<sup>PR</sup> results in rising the cell viability up to 159.8% compared to the cell viability of cells stimulated with PBS only (100%,  $p = 0.026$ ).

786-O<sup>PR</sup> cells show increased expression of Axl/c-MET, which might indicate a possible upregulation of alternative pathways stimulating cell proliferation.

The results of this thesis indicate that exosomes derived from TKI-resistant cells alter the cell viability of sensitive cells. To further investigate the observed impact of exosomes on the survival and proliferation and draw causal linkage between stimulation with exosomes and increase in cell viability, further experiments have to follow up. Additional characterization of exosomes and their cargo could contribute to explaining the development of resistance. Since there are several pathways regulating cell proliferation and survival, it is highly unlikely to be one single mechanism responsible for developing resistances. Rather it should be taken into consideration that a combination of several molecular mechanisms is involved.

## 2. Einleitung

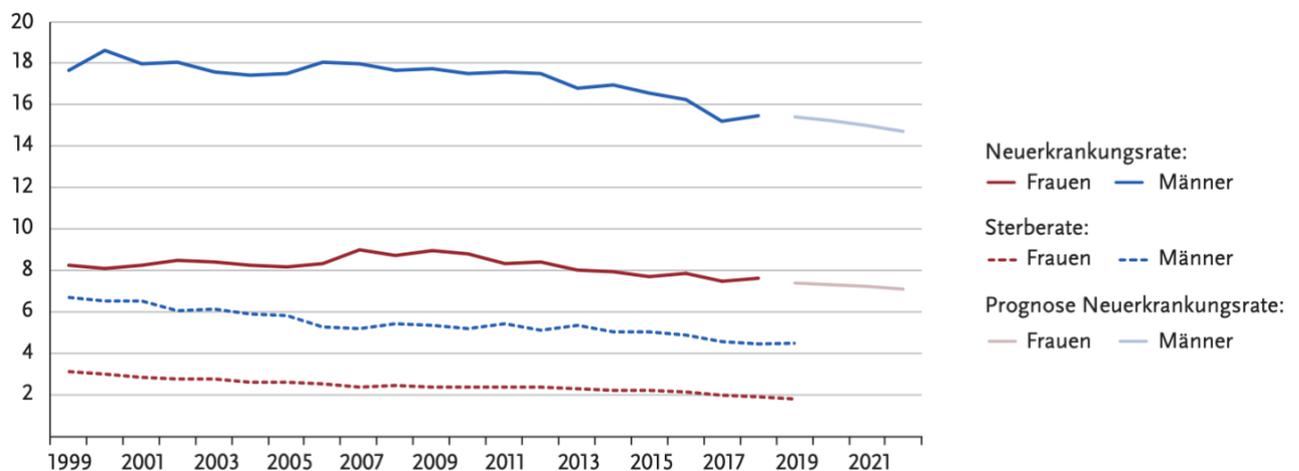
### 2.1 Klarzelliges Nierenzellkarzinom

#### 2.1.1 Epidemiologie

Maligne Tumoren der Niere gehören zu den häufigsten Tumoren der westlichen Industrienationen mit weltweit etwa 400.000 Neuerkrankungen jährlich [50]. In Deutschland zählen maligne Nierentumoren zu den zehn häufigsten Tumornewerkrankungen [53]. Im Jahr 2018 erkrankten in Deutschland 9350 Männer an einem malignen Nierentumor, 3108 starben daran [53]. Der prozentuale Anteil des Nierenzellkarzinoms an allen Tumornewerkrankungen betrug bei Männern in diesem Jahr 3,5%, womit das Nierenzellkarzinom an neunter Stelle der Tumorlokalisationen beim Mann steht [53]. Im Vergleich dazu erkrankten im Jahr 2018 5480 Frauen, 1931 starben an einem malignen Nierentumor. Prozentual machen Nierentumore bei Frauen einen Anteil von 2,4% aus und stehen daher erst an zehnter Stelle [53]. Männer sind von einem malignen Nierentumor annähernd doppelt so häufig betroffen wie Frauen (Abb. 1) [53]. Die Inzidenz des Nierenzellkarzinoms ist in den letzten Jahren in Deutschland leicht rückläufig [53].

Das mittlere Erkrankungsalter des klarzelligen Nierenzellkarzinoms liegt im 6. und 7. Lebensjahrzehnt: Frauen erkranken durchschnittlich in einem Alter von 71 bis 72 Jahren, Männer etwas früher im Alter von 68 Jahren [53].

**Abbildung 1:** Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten nach Geschlecht, ICD-10 C64, Deutschland 1999 – 2018/2019, Prognose (Inzidenz) bis 2022, modifiziert [53]



### 2.1.2 Risikofaktoren

Für das Nierenzellkarzinom sind einige Risikofaktoren bekannt. Grundsätzlich kann man innerhalb der Risikofaktoren zwischen hereditären und nicht-hereditären, teils beeinflussbaren, Faktoren unterscheiden. Als wichtigste beeinflussbare Risikofaktoren sind Nikotinabusus, Adipositas und arterielle Hypertonie zu nennen.

Durch das Rauchen von Zigaretten ist das Risiko sowohl für Patienten, die in ihrer Vergangenheit längere Zeit geraucht haben als auch für Patienten, die derzeit immer noch rauchen, deutlich erhöht [37,46,115]. Bei Rauchern mit mehr als 22,5 Pack Years wurde eine Risikoerhöhung um circa 50% im Vergleich zu Menschen, die niemals geraucht haben, festgestellt [115]. Gleichzeitig besteht ein dosisabhängiger Effekt: Je mehr ein Patient geraucht hat, desto höher ist das Risiko für die Erkrankung an einem Nierenzellkarzinom [87].

Adipositas stellt einen generellen Risikofaktor für eine maligne Tumorerkrankung dar [100]. Das Nierenzellkarzinom steht ebenfalls in Zusammenhang mit Übergewicht, neben Rauchern haben auch Übergewichtige ( $BMI > 25\text{kg/m}^2$ ) ein erhöhtes Risiko für ein Nierenzellkarzinom [17,100,115]. Dabei scheint der BMI auch einen Einfluss auf den histologischen Subtyp des Nierenzellkarzinoms zu haben: Ein steigender BMI wird vermehrt mit einem klarzelligem Nierenzellkarzinom assoziiert [112].

Als weiteren Risikofaktor ist eine arterielle Hypertonie zu nennen [46,115,167,173]. Patienten mit einem langfristig bestehenden Hypertonus haben ein erhöhtes Risiko, an einem Nierenzellkarzinom zu erkranken.

Weitere nicht-hereditäre Faktoren sind eine terminale Niereninsuffizienz [31,113,115], Alter und Geschlecht [115], sowie die Exposition gegenüber Toxinen wie Trichlorethylen [4,127]. Als wichtigster hereditärer Risikofaktor gilt vor allem das Von-Hippel-Lindau-Syndrom [91].

### 2.1.3 Histopathologische Einteilung nach WHO

Den größten Anteil der malignen Nierentumoren stellt mit 95% das Nierenzellkarzinom dar [53]. Das Nierenzellkarzinom geht vom Tubulusepithel der Nephrone aus. Urothelkarzinome des Nierenbeckens sind dagegen eher selten [83].

Der häufigste histologische Subtyp des Nierenzellkarzinoms macht mit circa 75-80% das klarzellige Nierenzellkarzinom aus [142]. Makroskopisch deutet eine helle, goldgelbe, teils mit nekrotischen und hämorrhagischen Arealen durchsetzte Schnittfläche auf ein klarzelliges Nierenzellkarzinom hin [83]. Mikroskopisch zeigen sich nestartig angeordnete Tumorzellen mit klarem Zytoplasma [83].

Entsprechend der Leitlinie *Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms*, zuletzt aktualisiert im Februar 2023, werden alle Nierentumoren entsprechend der WHO-Klassifikation der Nierentumoren eingeteilt (Tab. 1). Dies gewährleistet eine genaue Einschätzung der Differenzierung des Tumors, sodass eine Anpassung der Therapie erfolgen und mögliche prognostische Aussagen getroffen werden können [104].

**Table 1:** WHO-Klassifikation der Nierentumoren  
modifiziert nach [122]

<b>Epitheliale Nierenzelltumoren</b>	Klarzelliges Nierenzellkarzinom Multilokuläre zystische Neoplasie mit niedrigem Malignitätspotenzial Papilläres Nierenzellkarzinom Hereditäre-Leiomyomatose- und Nierenzellkarzinom-assoziiertes Nierenzellkarzinom Chromophobes Nierenzellkarzinom Sammelrohrkarzinom Medulläres Karzinom der Niere MiT-Familie der Translokationskarzinome Succinat-Dehydrogenase-defizientes Nierenzellkarzinom Muzinöses tubuläres und spindelzelliges Karzinom Erworbene Zystennieren-assoziiertes Nierenzellkarzinom Klarzelliges papilläres Nierenzellkarzinom Nierenkarzinom, nicht klassifiziert Papilläres Adenom Onkozytom
<b>Metanephrische Tumoren</b>	Metanephrisches Adenom Metanephrisches Adenofibrom Metanephrischer Stromatumor
<b>Nephroblastische und zystische Tumoren im Kindesalter</b>	Nephrogene Reste Nephroblastom Zystisches partiell differenziertes Nephroblastom Pädiatrisches zystisches Nephrom
<b>Mesenchymale Tumoren</b>	<i>Hauptsächlich im Kindesalter:</i> Klarzellsarkom Rhabdoidtumor Kongenitales mesoblastisches Nephrom Ossifizierender Nierentumor des Kindesalters
	<i>Hauptsächlich bei Erwachsenen:</i> Leiomyosarkom Angiosarkom Rhabdomyosarkom Osteosarkom Synoviales Sarkom Ewing-Sarkom Angiomyolipom

	Epitheloides Angiomyolipom Leiomyom Hämangiom Lymphangiom Hämangioblastom Juxtaglomerulärer Tumor Renomedullärer interstieller Tumor Solitärer fibröser Tumor
<b>Gemischte Epithel- und Stromatumorfamilie</b>	Adultes zystisches Nephrom Gemischter Epithel- und Stromatumor
<b>Neuroendokrine Tumoren</b>	Hoch differenzierter neuroendokriner Tumor Großzelliges neuroendokrines Karzinom Kleinzelliges neuroendokrines Karzinom Paragangliom
<b>Verschiedene Tumoren</b>	Hämatopoetische Tumoren der Niere Keimzelltumoren
<b>Metastasen</b>	

#### 2.1.4 Einteilung des Tumorstadiums

Zusätzlich zur histopathologischen Einteilung des Nierentumors erfolgt eine Klassifikation anhand des TNM-Systems (Tab. 2) und ein Grading des Tumors nach WHO und International Society of Urothology (ISUP) (Tab. 3).

**Tabelle 2:** TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinoms 2017 nach [10]

<b>Primärtumor</b>	
<b>T0</b>	Kein Anhalt für Primärtumor
<b>T1</b>	Tumor ≤ 7 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
<b>T1a</b>	Tumor 4 cm oder weniger in größter Ausdehnung
<b>T1b</b>	Tumor mehr als 4 cm, aber nicht mehr als 7 cm in größter Ausdehnung
<b>T2</b>	Tumor > 7 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
<b>T2a</b>	Tumor mehr als 7 cm, aber nicht mehr als 10 cm in größter Ausdehnung
<b>T2b</b>	Tumor mehr als 10 cm in größter Ausdehnung
<b>T3</b>	Tumor breitet sich in größere Venen aus oder infiltriert direkt perirenales Gewebe, jedoch nicht in ipsilaterale Nebenniere und nicht über die Gerota-Faszie hinaus
<b>T3a</b>	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in die Nierenvene oder ihre segmentalen Äste oder Tumor infiltriert perirenales oder peripelvines Fettgewebe, aber nicht über die Gerota-Faszie hinaus.

<b>T3b</b>	Tumor mit Ausbreitung in die Vena cava unterhalb des Zwerchfells
<b>T3c</b>	Tumor mit Ausbreitung in die Vena cava oberhalb des Zwerchfells oder mit Infiltration der Wand der Vena cava
<b>T4</b>	Tumor infiltriert über die Gerota-Faszie hinaus (eingeschlossen die kontinuierliche Ausbreitung in die ipsilaterale Nebenniere)
<b>Regionale Lymphknotenmetastasen</b>	
<b>NX</b>	Benachbarte (regionäre) Lymphknoten sind nicht beurteilbar
<b>N0</b>	Kein Anhalt für benachbarte Lymphknotenmetastasen
<b>N1</b>	Metastase in einem benachbarten Lymphknoten
<b>N2</b>	Metastase in mehr als einem benachbarten Lymphknoten
<b>Fernmetastasen</b>	
<b>MX</b>	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
<b>M0</b>	Kein Anhalt für Fernmetastasen
<b>M1</b>	Fernmetastasen treten am häufigsten in der Lunge, im Skelett und in den Lymphknoten, eher selten im Gehirn und in der Leber auf.

**Tabelle 3:** Stadieneinteilung nach Union for International Cancer Control (UICC) 2017 (8. Version) nach [10]

<b>UICC-Stadium</b>	<b>TNM</b>
Stadium I	T1, M0, N0
Stadium II	T2, M0, N0
Stadium III	T3, M0, N0 oder T1-T3, N1, M0
Stadium IV	T4 oder N2 oder M1

Mithilfe des Grading wird die histopathologische Differenzierung des Tumorgewebes eingeteilt (Tab. 4). Je undifferenzierter das Tumorgewebe ist, desto höher ist die Gradingstufe. Das häufig benutzte Fuhrman-System zur Graduierung von Nierenzellkarzinomen wurde 2015 durch das Grading nach World Health Organisation (WHO) und International Society of Urothology (ISUP) ersetzt [123]. Die ISUP-Graduierung erfolgt ausschließlich durch Beurteilung der Nukleolen, wohingegen das Fuhrman-System auf der Beurteilung der Kerngröße, der Kernpolymorphie und der Größe des Nukleolus beruht [123].

**Table 4:** Grading nach International Society of Urothology (ISUP)  
modifiziert nach [123]

Grading	Beschreibung
G1	Fehlende oder unauffällige basophile Nukleolen bei 400-facher Vergrößerung
G2	Erkennbare und eosinophile Nukleolen bei 400-facher Vergrößerung; sichtbar, aber nicht prominent bei 100-facher Vergrößerung
G3	Erkennbare und eosinophile Nukleolen bei 100-facher Vergrößerung
G4	Extreme nukleäre Pleomorphie und/oder mehrkernige Riesenzellen und/oder rhabdoide und/oder sarkomatoide Differenzierung

### 2.1.5 Symptomatik

In frühen Stadien präsentiert sich das Nierenzellkarzinom oft symptomarm [83]. In der Vergangenheit wurden Patienten mit einem Nierenzellkarzinom durch persistierende Hämaturie, Flankenschmerzen und einen palpablen Nierentumor erstmals klinisch auffällig. Diese klassische Symptomtrias tritt heute nur noch bei weniger als 15% der Patienten auf [132]. Etwa 10-40% der Patienten mit Nierenzellkarzinomen entwickeln ein paraneoplastisches Syndrom mit möglichen endokrinen und systemischen Symptomen (Tab. 5) [132].

**Table 5:** Mögliche Symptome eines paraneoplastischen Syndroms beim Nierenzellkarzinom  
modifiziert nach [132]

Endokrin	Systemisch
Hyperkalzämie	Amyloidose
arterielle Hypertonie	Anämie
Polyzythämie	Neuromyopathie
nicht-metabolische Leberinsuffizienz	Vaskulopathie
Galaktorrhoe	Nephropathie
Cushing-Syndrom	Koagulopathie
Veränderungen des Glukosestoffwechsels	Prostaglandinerhöhung

Durch die verbesserten technischen Möglichkeiten zur Bildgebung und den häufigen Einsatz von Ultraschallgeräten und CT- beziehungsweise MRT-Untersuchungen sind Nierenzellkarzinome häufig ein Zufallsbefund bei anderen diagnostischen Untersuchungen [83,102,121,161].

### 2.1.6 Diagnostik

Ein beträchtlicher Teil der Nierenzellkarzinome wird als Zufallsbefund bei Ultraschall oder CT-Untersuchungen diagnostiziert, die zur Abklärung einer anderen Problematik veranlasst wurden [10,88].

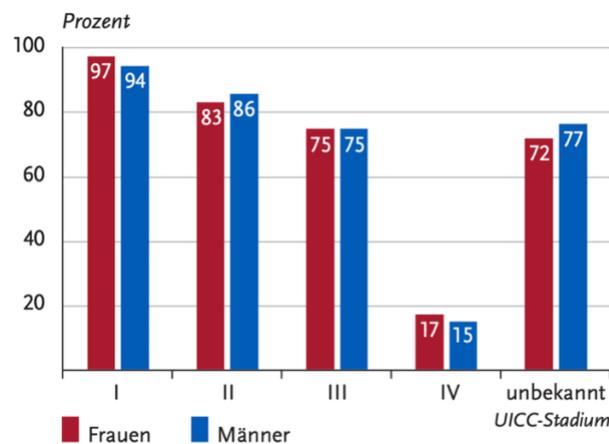
Bei Verdacht auf ein Nierenzellkarzinom erfolgt zunächst eine allgemeine körperliche Untersuchung, bei der auf einen palpablen Nierentumor, Flankenschmerzen und Lymphadenopathien geachtet wird. Eine Varikozele und/oder beidseitige Beinödeme können auf eine Gefäßinvasion des Tumors in die Vena Cava inferior mit resultierender unterer Einflusstauung hindeuten [10,62]. Zusätzlich sollte eine klassische B-Symptomatik mit Fieber, Gewichtsverlust und Nachtschweiß erfragt werden. Husten, eine generalisierte Lymphadenopathie und Knochenschmerzen mit eventuellen pathologischen Frakturen können auf eine Metastasierung hinweisen [10,62]. Bei der Urinuntersuchung ist eine Hämaturie möglich [10]. Laborchemisch werden die Nierenretentionsparameter zur Evaluation der Nierenfunktion bestimmt. Weitere Laborparameter können Entzündungsparameter, wie das C-reaktive Protein (CRP), Hämoglobin und ein großes Blutbild, Calcium, Gerinnungsstatus, die Laktatdehydrogenase (LDH) und Leberwerte, wie die alkalische Phosphatase (AP) und das Serumalbumin, sein [10,62].

Die Abdomensonographie als etablierter Teil einer primären Diagnostik wird zur Beurteilung der Nieren regelmäßig verwendet, um eine Aussage über Morphologie, Stauung oder mögliche Raumforderungen treffen zu können [66,68]. In der Sonographie sind kleinere Tumoren allerdings nicht adäquat darstellbar [86]. Durch kontrastmittelgestützte Ultraschalluntersuchungen kann die Zuverlässigkeit der Sonographie jedoch verbessert werden, da so eine differenzierte Perfusionsdarstellung möglich ist [33,68].

### 2.1.7 Prognose

Die Prognose bei Erkrankung an einem Nierenzellkarzinom ist von histopathologischen und klinischen Faktoren abhängig [10]. Zu den klinisch prognostischen Faktoren zählen der Performance Status, das Auftreten von Metastasen in Abhängigkeit von Zeitpunkt und Ort, Symptome, hämatologische Parameter (Hb-Wert, Anzahl der Thrombozyten, Neutrophilen) und LDH [104]. Generell bedeutet ein höheres Tumorstadium allerdings eine schlechte Prognose, das relative 5-Jahres-Überleben sinkt im UICC-Stadium IV rapide ab [53] ( Abb. 2). Da etwa 50% der Diagnosen im niedrigen Tumorstadium I gestellt werden, ist die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Nierenzellkarzinompatienten günstig. Sie liegt für Frauen bei 76 und für Männer bei 78% [53].

**Abbildung 2:** Relatives 5-Jahres-Überleben nach UICC-Stadium und Geschlecht modifiziert nach [53]



Es existieren derzeit zahlreiche Nomogramme zur individuellen Prognoseabschätzung, da das TNM-System bezüglich der Vorhersagekraft beim Nierenzellkarzinom zu ungenau ist [104]. Grundsätzlich kann bei den Nomogrammen in prä- und postoperative Nomogramme unterschieden werden [104]. Mithilfe der präoperativen Nomogramme soll eine Aussage über ein mögliches Rezidivrisiko nach Tumorentfernung getroffen werden können. Als wichtigstes präoperatives Nomogramm ist die Cindolo-Formel zu nennen [32].

Bei den postoperativen Nomogrammen sind verschiedene Endpunkte definiert und zur Beurteilung werden auch verschiedene Faktoren berücksichtigt (Tab. 6).

**Tabelle 6:** Postoperative Nomogramme zur Risikobeurteilung bei Patienten mit Nierenzellkarzinom modifiziert nach [104]

Nomogramm	Endpunkte	Faktoren im Modell
UCLA Integrated Staging System (UISS-Modell)	Gesamt-/tumorspezifisches Überleben, Progressionsfreiheit	- T-, N- und M-Kategorie - ECOG-Performance-Status - Fuhrman-Grad
SSIGN-Score	RCC-spezifisches Überleben postoperativ	- T-, N- und M-Kategorie - Tumordurchmesser (> oder < 5 cm) - Fuhrman-Grad - Tumornekrose vorhanden
Leibovich-Score	metastasenfreies Überleben postoperativ	- T- und N-Kategorie - Tumordurchmesser (> oder < 10 cm) - Fuhrman-Grad - Tumornekrose vorhanden
Kattan-Nomogramm	5-Jahres-progressionsfreies Überleben postoperativ	- T-Kategorie - Tumordurchmesser - Histologischer Subtyp - Symptome

## 2.1.8 Therapie

Die Therapie des Nierenzellkarzinoms ist entsprechend der aktuellen S3-Leitlinie von der Ausbreitung des Primärtumors abhängig, die mithilfe der T-Kategorie des TNM-Stadiums klassifiziert wird (Tab. 7). Grundsätzlich zu unterscheiden sind Therapieoptionen in einer nicht-metastasierten Situation im Vergleich zu einem bereits fortgeschrittenen Krankheitsstadium mit nachgewiesener Metastasierung.

**Tabelle 7:** Therapieempfehlung bei Nierenzellkarzinom entsprechend des Tumorstadiums modifiziert nach [104]

Primärtumor	Therapieempfehlung
T1 (lokal)	Nierenteilresektion
T2 (lokal)	Nierenteilresektion, wenn möglich (ansonsten Nephrektomie)
T3	Nephrektomie (+ Lymphadenektomie bei N1)
T4 oder Metastasen	Systemtherapie

### 2.1.8.1 Therapie des nicht-metastasierten Nierenzellkarzinoms

Eine kurative Therapie kann alleine durch eine komplette Resektion des Tumors erfolgen und wird daher bei allen Patienten mit lokal begrenztem, resektablen Nierenzellkarzinomen empfohlen [104]. Als mögliche Folgen einer Nephrektomie werden eine chronische Niereninsuffizienz, die damit einhergehende erhöhte kardiovaskuläre Mortalität sowie ein verkürztes Überleben diskutiert [57,84,119,153,158]. Um diese Risiken gering zu halten, ist eine organerhaltende Nierenteilresektion immer einer Nephrektomie vorzuziehen, wenn dies technisch möglich ist [104]. Sowohl die Nephrektomie als auch die Nierenteilresektion können entweder laparoskopisch oder offen-chirurgisch durchgeführt werden. Bezüglich des Überlebens konnte kein Unterschied zwischen den OP-Verfahren festgestellt werden. Als Vorteile der Laparoskopie werden jedoch ein geringerer Blutverlust, kürzere Hospitalisierungs- und Genesungszeiten, sowie ein niedrigerer Analgetikabedarf im Vergleich zur offen-chirurgischen Technik aufgeführt [76]. Ein laparoskopisches OP-Verfahren stellt daher bei ausreichender Erfahrung des Operateurs eine Alternative zur offen-chirurgischen Operation dar [104]. Eine evidenzbasierte Empfehlung einer roboter-assistierten Operation kann derzeit noch nicht ausgesprochen werden [8].

Bei kleinen Nierentumoren (= SRM, small renal masses) mit einer Größe von weniger als 4 cm kann die Option der aktiven Überwachung („Active Surveillance“) gewählt werden, wenn eine operative Therapie durch den Patient oder die Patientin nicht gewünscht wird [104]. Diese Option besteht bisher nur für ein ausgewähltes Patientenkollektiv, wie beispielsweise für

Patienten mit weiteren Komorbiditäten, einem hohen Lebensalter oder einer bereits verkürzten Lebenserwartung [104]. Die aktive Überwachung beim Nierenzellkarzinom stellt keinen letztlich kurativen Therapieansatz dar [104]. Die Überwachung erfolgt beim Nierenzellkarzinom lediglich über das Wachstum und die TumorgroÙe, da ein repräsentativer Tumormarker bisher fehlt [104].

Bei Patienten mit kleinen Nierentumoren und bereits vorhandenen Komorbiditäten oder eingeschränkter Lebenserwartung besteht ebenfalls die Möglichkeit, die Tumormasse durch Radiofrequenz- oder Kryoablation zu reduzieren [104]. Einen kurativen Therapieansatz stellt diese Option allerdings ebenfalls nicht dar. Vor der Ablationstherapie soll eine Tumorbiopsie erfolgen, da diese Therapieoption nur bei malignen Tumoren indiziert ist [104].

#### 2.1.8.2. Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms

Eine kurative Therapie des Nierenzellkarzinoms kann nur durch die komplette Exzision des Tumorgewebes erzielt werden, daher bedeutet ein metastasiertes Stadium der Krankheit meist eine palliative Situation [10]. Im Falle einzelner Metastasen kann eine chirurgische Entfernung weiterhin das Outcome verbessern, die komplette Exzision der Metastasen bedeutet ein verbessertes Überleben [38,39].

Sobald die Metastasierung so weit fortgeschritten ist, dass keine kurative Therapie durch eine zytoreduktive Therapie mehr angestrebt werden kann, wird eine systemische Therapie verabreicht [10]. Das Nierenzellkarzinom ist fast komplett resistent gegenüber den geläufigen Formen der Chemotherapie, die molekularen Mechanismen dieser Resistenz sind Bestandteil aktueller Forschung [5,22,104]. Bis Anfang der 2000er Jahre bestand die Therapie des Nierenzellkarzinoms daher aus der Zytokingabe von Interleukin-2 (IL-2) und Interferon alpha (IFN- $\alpha$ ), womit auch ein verbessertes Überleben erzielt werden konnte [51,182]. Da das Ansprechen auf eine alleinige Gabe von IL-2 und IFN- $\alpha$  allerdings nur 15-25% betrug, wird derzeit laut der aktuellen Leitlinie eine alleinige Zytokintherapie nicht mehr empfohlen [104,144].

Mit der Einführung einer systemischen Therapie, anfänglich zunächst bestehend aus Tyrosinkinaseinhibitoren oder mTOR-Inhibitoren, später ergänzt durch Checkpointinhibitoren oder einer Kombination der Substanzen, konnte eine weitere Verbesserung des Outcomes erzielt werden (Tab. 8) [125,155].

**Tabelle 8:** Zugelassene Medikamentenklassen für die Therapie des Nierenzellkarzinoms (Übersicht)

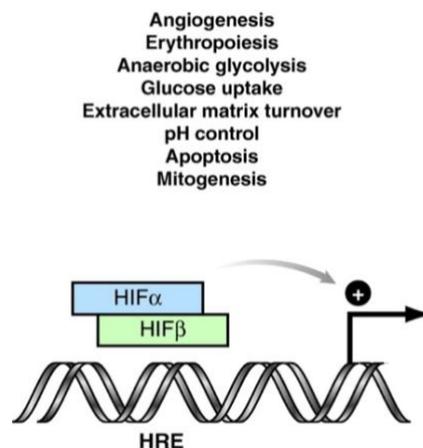
Medikamentenklasse	Substanzen
Tyrosinkinaseinhibitoren	Sorafenib Sunitinib Pazopanib Axitinib Lenvatinib Cabozantinib Tivozanib
Checkpointinhibitoren	Pembrolizumab (PD-1-Inhibitor) Nivolumab (PD-1-Inhibitor) Ipilimumab (CTLA-4-Inhibitor)
mTOR-Inhibitoren	Everolimus Temsirolimus
anti-VEGF-Antikörper	Bevacizumab
Zytokine	Interleukin-2 (IL-2) Interferon alpha (IFN- $\alpha$ )

### 2.1.8.3 Zugrundeliegende molekulare Mechanismen der systemischen Therapie

Bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen liegt in 50 bis 82% der Fälle eine Mutation des Von-Hippel-Lindau-Gens vor (VHL) [12,56,128]. Eine VHL-Mutation führt dazu, dass der Hypoxia-inducible-Factor (HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$ ) akkumuliert. Physiologisch wird HIF durch einen E3-Ligase-Komplex mithilfe des VHL-Genprodukts, dem Protein pVHL, ubiquitiniert und damit für den proteasomalen Abbau markiert [91]. Durch das Fehlen des pVHL-Substrats wird HIF nicht mehr ubiquitiniert und daher nicht abgebaut.

HIF wirkt als Transkriptionsfaktor an Genen, die eine Adaption an akute oder chronische Hypoxie-Zustände der Zellen möglich machen [91]. Die VHL-Mutation führt somit zu autonomen Veränderungen der Tumorzellen in Bezug auf die Zellproliferation und -differenzierung, sowie einer gesteigerten Angiogenese (Abb. 3) [91].

**Abbildung 3:** Hypoxia-inducible Factor (HIF)-regulierte Prozesse  
modifiziert nach [91]

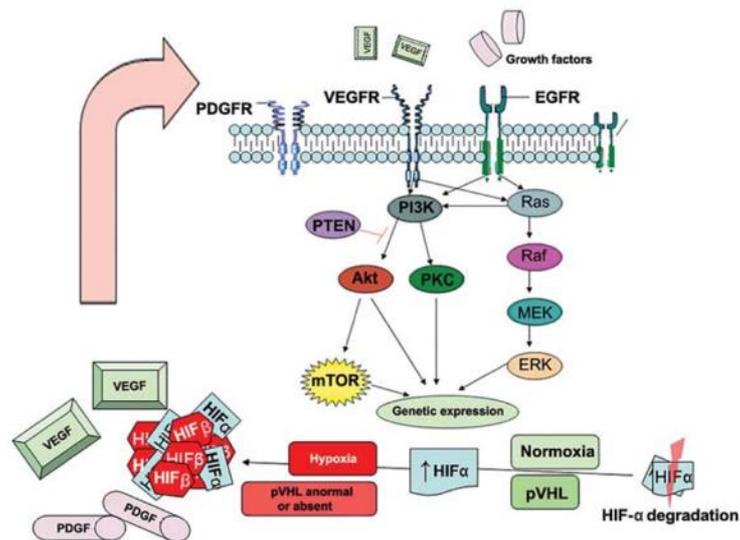


Die Akkumulation von HIF begünstigt eine Überexpression von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Platelet Derived Growth Factor (PDGF), sodass im Tumorgewebe eine Neoangiogenese gefördert wird, obwohl dort Normoxie herrscht (Abb. 4) [134]. Dieser molekulare Mechanismus erklärt die makroskopische Hypervaskularisation bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen [83]. Aufgrund der Aktivierung von Erythropoietin durch den Transkriptionsfaktor HIF wird auch die Erythropoese gesteigert [91,148].

Zusätzlich werden auch Gene aktiviert, die für den Glukosestoffwechsel der Zellen und die Glukoseaufnahme zuständig sind, wie Glukosetransporter, und Gene für die anaerobe Glykolyse, wie Pyruvatkinase und Laktatdehydrogenase [148]. So kann das Überleben der Tumorzellen verbessert werden.

Bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen wirkt sich eine VHL-Mutation auch auf die Apoptose der Tumorzellen aus [91]. Für Zellen mit einem Verlust der VHL-Funktion konnte gezeigt werden, dass sie resistenter gegen eine Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-vermittelte Zytotoxizität sind, als Zellen, bei denen das VHL-Gen intakt ist [24].

**Abbildung 4:** Überexpression von VEGF und PDGF durch Akkumulation von HIF modifiziert nach [75]



Im Organismus aller Säugetiere gibt es verschiedene Signalwege, die durch Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) reguliert werden [99,169]. Dazu zählen beispielsweise die Proliferation, das Wachstum und das Überleben von Zellen [99,169,175]. mTOR hat auch eine Funktion in der Aktivierung des Hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  in Tumorzellen und beeinflusst so die Neoangiogenese [85]. Die mTOR-Regulation ist vom Nährstoffangebot und weiteren Umwelteinflüssen abhängig, sodass Säugetiere auf unterschiedliche Gegebenheiten reagieren können [99].

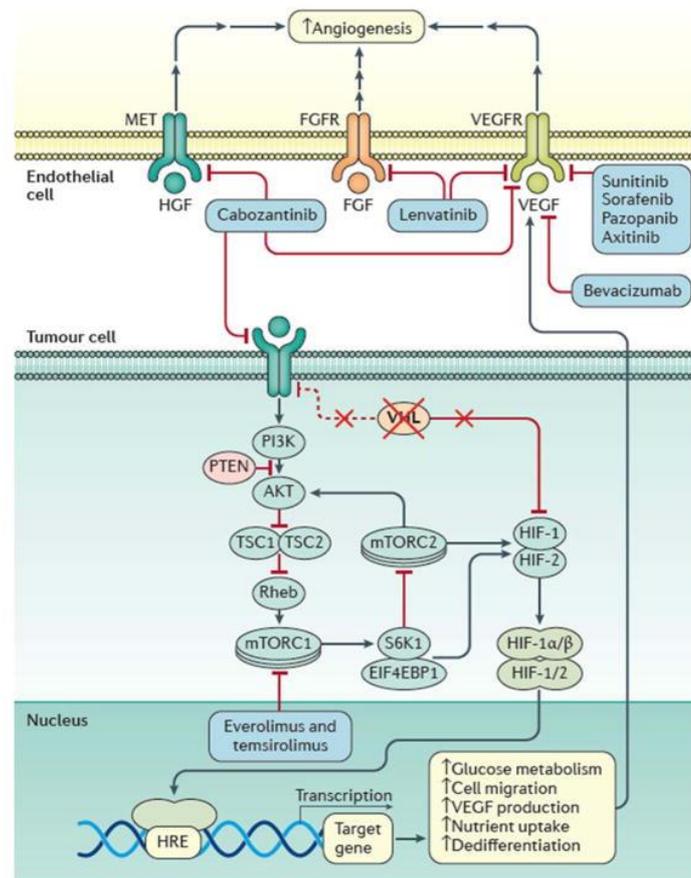
Die meisten Tumorzellen nutzen den Mechanismus der Immunevasion, um einer gezielten Apoptoseinduktion durch körpereigene Immunzellen zu entgehen [97]. Aktivierte T-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche den Programmed-Cell-Death-Receptor 1 (PD-1), der zur Induktion der Apoptose bei anderen Zellen dient. Physiologisch kann an den PD-1-Rezeptor ein Ligand (Programmed-Cell-Death-Receptor-Ligand 1 (PD-L1)) binden, der die Aktivität der T-Zellen herunterreguliert und so eine überschießende Immunantwort verhindert [48,93].

Tumorzellen präsentieren über den Major Histocompatibility Complex (MHC) tumorspezifische Antigene auf ihrer Zelloberfläche, die von aktivierten T-Zellen erkannt werden können [105]. Wenn die T-Zellen tumorassoziierte Antigene gebunden und prozessiert haben, kann dies zu einer antitumoralen Immunantwort der T-Zellen führen. Durch Freisetzung von zytotoxischen Mediatoren kann bei der Tumorzelle eine Apoptose induziert werden.

Für Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass sie vermehrt PD-L1 auf ihrer Oberfläche exprimieren [181]. Indem sie an den Programmed-Cell-Death-Receptor 1 (PD-1) der Immunzellen binden, wird eine antitumorale Antwort der T-Zellen verhindert [139,160]. Diese Interaktion bewirkt physiologisch eine Herunterregulierung der T-Zell-Aktivität, sodass die körpereigene Immunabwehr geschwächt ist [23,93].

#### 2.1.8.4 Wirkungsweise der systemischen Therapie

**Abbildung 5:** VHL-Inaktivierung beim klarzelligen Nierenzellkarzinom und Bedeutung für systemische Therapie modifiziert nach [83]

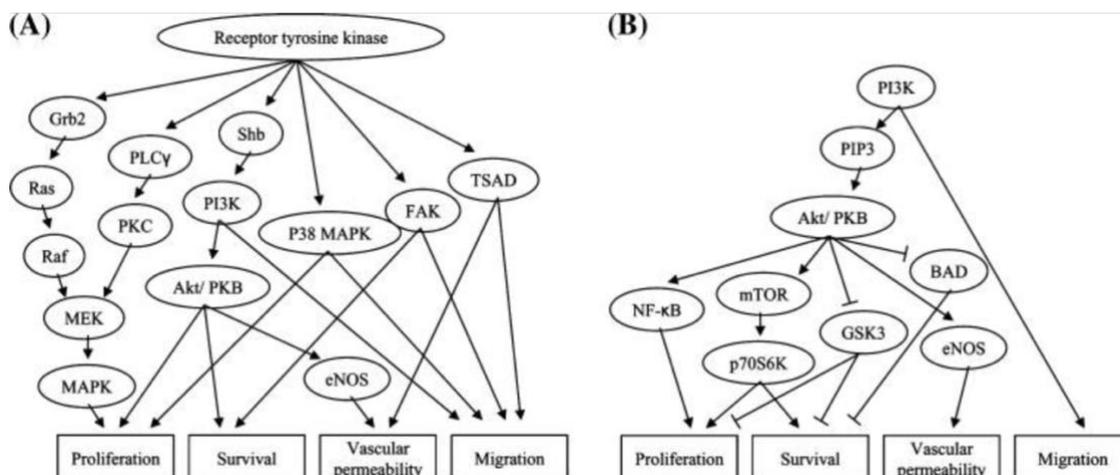


Durch Rezeptor-Tyrosinkinasen werden Pathways reguliert, die einen Einfluss auf die Proliferation, das Überleben, die Migration und die vaskuläre Permeabilität von Zellen haben (Abb. 5, Abb. 6) [58]. Anti-angiogenetische Medikamente wie Tyrosinkinaseinhibitoren und anti-VEGF-Antikörper hemmen die Bildung von neuen tumorversorgenden Blutgefäßen, sodass das Tumorwachstum aufgrund fehlender Nährstoffe stagniert (Abb. 6) [19,26]. Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) fungiert als Wachstumsfaktor, durch die Blockade des PDGFR wird somit auch das Wachstum und die Proliferation der Tumorzellen selbst gehemmt [74]. Das gleiche Prinzip gilt für den Fibroblast-derived growth factor receptor (FGFR), der ebenfalls das Wachstum und die Proliferation der Zellen positiv beeinflusst und durch Tyrosinkinaseinhibitoren in seiner Funktion gehemmt wird [131]. Folglich wird letztlich auch das Tumorzellwachstum inhibiert.

Für den VEGF-Antikörper Bevacizumab konnte auch gezeigt werden, dass er direkte Effekte auf die Tumorzellen selbst hat und zur verstärkten Apoptose der Tumorzellen führt (Abb. 7) [151,171].

Sunitinib als Tyrosinkinaseinhibitor hat ebenfalls einen Einfluss auf das Tumorzellüberleben und die Proliferation: Bei Zelllinien eines humanen Nebennierenrindenzellkarzinoms senkt Sunitinib die Zellviabilität und die Proliferation, während die Apoptoserate gesteigert wird [52,151].

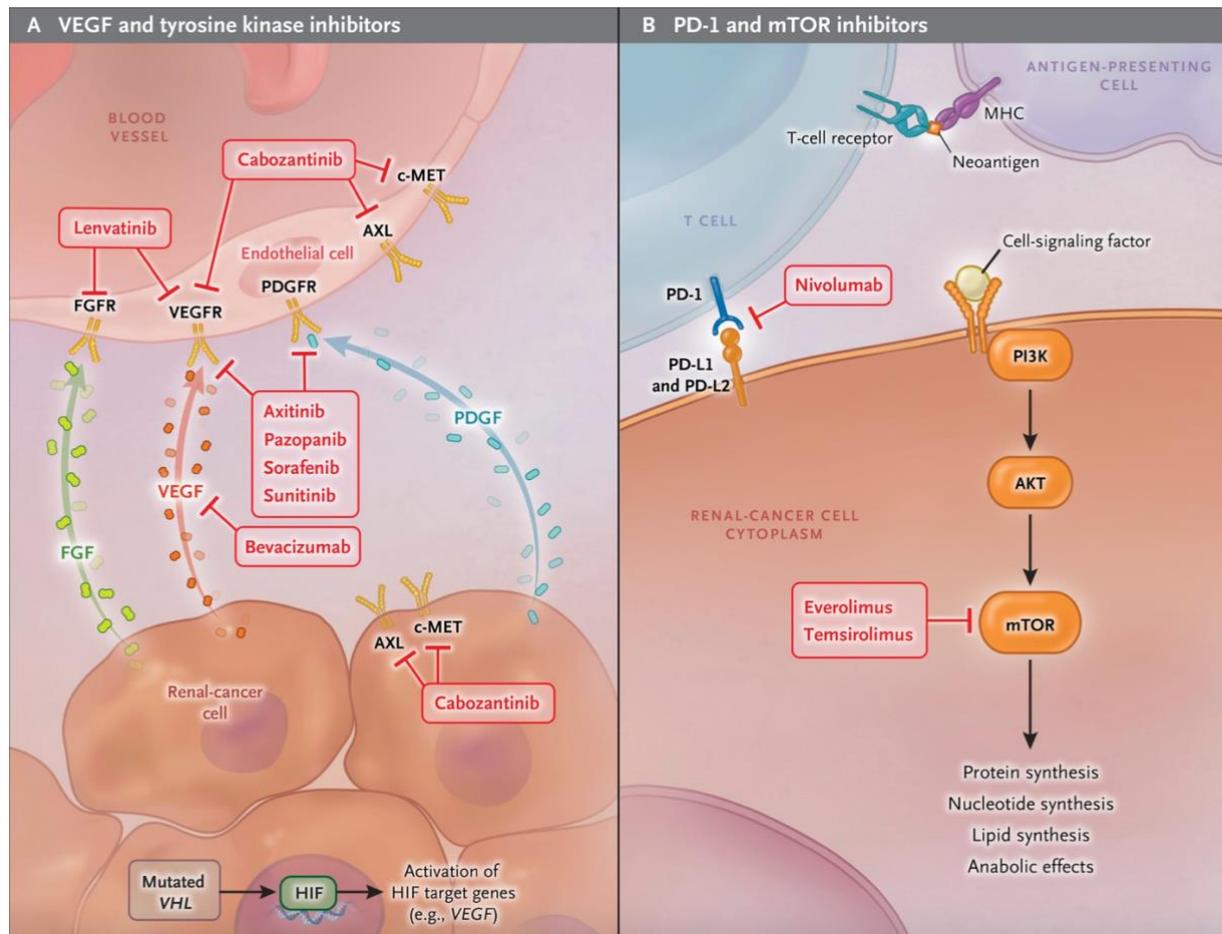
**Abbildung 6:** Signaltransduktion von Tyrosinkinase-regulierten Prozessen modifiziert nach [58]



Sowohl Temsirolimus als auch Everolimus bilden mit dem intrazellulär vorliegenden Protein FKBP12 einen Komplex, der mTOR bindet (Abb. 7) [29,95,152]. Wenn mTOR im Komplex gebunden ist, kann es seiner Funktion als Serin-Threonin-Kinase nicht mehr nachkommen, die ein Teil des Downstream-Pathways von PI3-/Akt ist [146,175]. Durch die fehlende Translation zellzyklusregulierender Proteine bleibt die Zelle in der G1-Phase des Zellzyklus stehen [69,120]. Zusätzlich zur Proliferations- und Wachstumshemmung hat die mTOR-Blockade auch einen Effekt auf die Produktion von angiogeneseregulierenden Proteinen, sodass eine Hemmung von mTOR auch einen inhibierenden Effekt auf die Angiogenese hat [133].

Die so genannten Checkpointinhibitoren blockieren wahlweise entweder PD-1 oder PD-L1, sodass die T-Zellen weiter aktiv bleiben und die Tumorzellen durch das Immunsystem eliminiert werden können [97]. Die Blockade des Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Protein 4 (CTLA-4) auf Tumorzellen erzielt den gleichen Effekt wie die Blockade des PD-1-Rezeptors und steigert die körpereigene Tumorabwehr [101,176].

**Abbildung 7:** Angriffspunkte der systemischen Therapie modifiziert nach [30]



### 2.1.8.5 Therapieschemata

Die systemische Therapie des Nierenzellkarzinoms ist von der individuellen Risikokonstellation der Patienten abhängig. Für die Risikobewertung gibt es verschiedene Modelle, das geläufigste ist allerdings die Risikobewertung nach MSKCC (Tab. 9) [104,124].

**Tabelle 9:** Evaluation des individuellen Risikoprofils anhand der Motzer-Kriterien (MSKCC-Score) modifiziert nach [77,104,124]

Risikofaktoren	Grenzwert
Karnofsky Performance Status	< 80 %
LDH	> 1,5 über dem Normwert
Hämoglobin	unter dem Normwert
Erhöhtes korrigiertes Serumkalzium	> 10 mg/dl
Zeitraum von der Erstdiagnose bis Beginn der systemischen Therapie	< 1 Jahr

Risikoprofil	Anzahl der Risikofaktoren
Niedrig	0
Intermediär	1 – 2
Ungünstig	ab 3

Entsprechend der Evaluation des Risikoprofils erfolgt dann die systemische Therapie (Tab. 10 + 11).

**Tabelle 10:** Systemtherapieoptionen gemäß Risikoprofil in der Erstlinientherapie des Nierenzellkarzinoms modifiziert nach [103]

Risikoprofil	Standardempfehlung	Option
Niedrig	Cabozantinib + Nivolumab Pembrolizumab + Axitinib Pembrolizumab + Lenvatinib Avelumab + Axitinib	Bevazizumab + IFN Pazopanib Sunitinib Tivozanib
Intermediär	Cabozantinib + Nivolumab Ipilimumab + Nivolumab Pembrolizumab + Axitinib Pembrolizumab + Lenvatinib Avelumab + Axitinib	Cabozantinib Sunitinib Pazopanib Tivozanib Bevazizumab + IFN
Ungünstig	Cabozantinib + Nivolumab Ipilimumab + Nivolumab Pembrolizumab + Axitinib Pembrolizumab + Lenvatinib Avelumab + Axitinib	Cabozantinib Sunitinib Temsirolimus Pazopanib

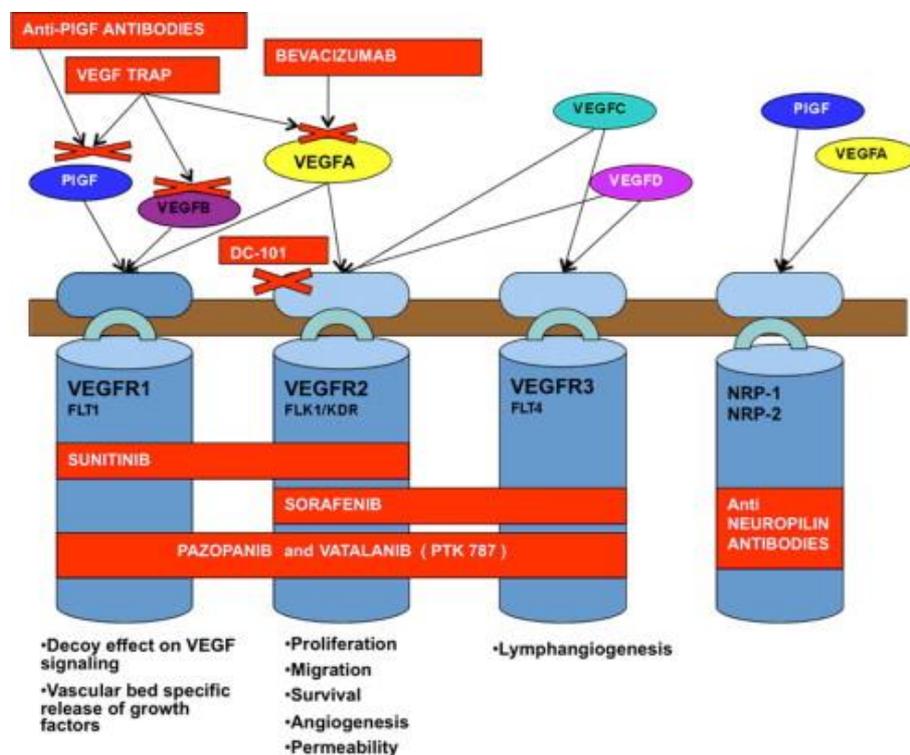
**Tabelle 11:** Systemtherapieoptionen gemäß Vortherapie in der Zweitlinientherapie des Nierenzellkarzinoms modifiziert nach [104]

Vortherapie	Standardempfehlung	Option
VEGF/R-Inhibitor	Cabozantinib Nivolumab	Lenvatinib + Everolimus Alternativ anderer TKI
Checkpointinhibitor	-	TKI-basierte Therapie
Kombination CPI/TKI	-	TKI-basierte Therapie
Temsirolimus	-	TKI Nivolumab

## 2.1.9 Spezifische Wirkung von Pazopanib

Pazopanib ist ein Tyrosinkinaseinhibitor, der im Jahr 2010 von der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) für die Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms zugelassen wurde. Oral eingenommen hemmt Pazopanib die Angiogenese in Tumorgewebe über eine Wirkung an mehreren pro-angiogenetischen Pathways (Abb. 8) [156]. Pazopanib inhibiert den Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR) Typ 1 bis 3, den Platelet Derived Growth Factor Receptor (PDGFR) Typ  $\alpha$  und  $\beta$ , sowie den Stammzellrezeptor c-KIT [154].

**Abbildung 8:** Anti-angiogenetische Medikamente und ihre Zielstrukturen modifiziert nach [9]

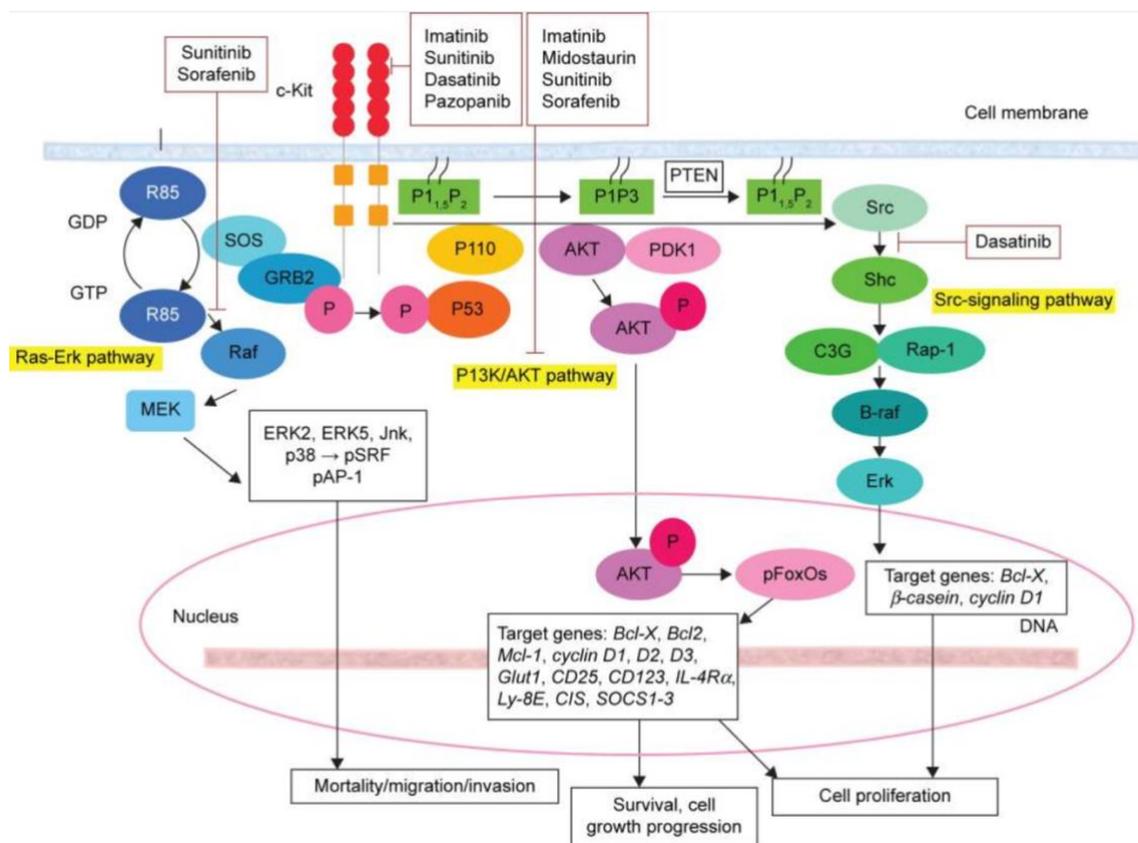


PDGFR ist als hauptsächlich parakrin agierender Wachstumsfaktor in Signalwege involviert, die die Zellproliferation, -differenzierung und -migration stimulieren [6]. Analog dazu bewirkt eine Aktivierung der durch VEGFR regulierten Signalwege das Wachstum und die Migration von Endothelzellen, sowie ein verbessertes Überleben bereits existierender Endothelzellen [78]. Eine Hemmung der beiden Tyrosinkinasen durch Pazopanib führt daher zu einer verminderten Proliferation und Migration der Tumorzellen, sowie zu einem verringerten Tumorzellüberleben.

Als Proto-Onkogen ist der Stammzellrezeptors c-KIT (CD117) für die Entwicklung und das Überleben von Zellen zuständig, indem es den Stat5-P13Akt-Signalweg aktiviert (Abb. 9) [36,177].

Nach Bindung des Stammzellfaktors kann der Rezeptor-Liganden-Komplex durch Autophosphorylierung eine Signaltransduktionskette stimulieren, die zur Differenzierung und Proliferation von Mastzellen führt und anti-apoptotische Effekte auf die Zellen hat [36,96]. Zusätzlich trägt c-KIT zum Stammzell-Erhalt und zur Stammzell-Differenzierung bei [1,130]. Eine Blockade von c-KIT führt daher ebenfalls zu einem verminderten Zellüberleben, einer geringeren Zellproliferation und abnehmender Migration und Invasion.

**Abbildung 9:** Rolle von c-KIT in der Signaltransduktion und Hemmung durch TKIs modifiziert nach [1]



### 2.1.10 Entwicklung einer Therapieresistenz unter Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren

Bei der Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren kommt es bei quasi allen Patienten nach einem Median von 6 bis 15 Monaten zur Entwicklung einer Medikamentenresistenz [16,19,143]. Die zugrundeliegenden Mechanismen der Resistenzentwicklung gegen Tyrosinkinaseinhibitoren sind Bestandteil aktueller Forschung und Thema dieser Promotionsarbeit. Grundsätzlich kann bei der Therapieresistenz eines Tumors in adaptive und intrinsische Resistenzmechanismen unterschieden werden [16,116].

Eine Möglichkeit zur Erklärung der Resistenz gegen Tyrosinkinaseinhibitoren ist das Umgehen der anti-angiogenetischen Effekte, auch als „Angiogenic Switch“ bezeichnet [20]. Indem alternative proangiogenetische Pathways vermehrt aktiviert werden, kann die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Tumors weiterhin gewährleistet werden [9,25]. Die spezifische Hemmung eines einzelnen Pathways durch die TKIs erfolgt zwar weiterhin, der anti-angiogenetische Effekt ist allerdings langfristig nur sehr niedrig. Hinzu kommt, dass eine Resistenz gegen TKIs transient ist: Nachdem das Medikament für 12 Wochen abgesetzt worden ist, erreichen Tumorzellen in der Zellkultur wieder die ursprüngliche Sensibilität gegen TKIs [59,60].

Als weitere Möglichkeit gilt die verringerte Wirksamkeit der Tyrosinkinaseinhibitoren durch eine Aufnahme und Sequestration der TKIs [59,116]. Indem Lysosomen resistenter Nierenzellkarzinome die TKIs aufnehmen, wird der Wirkstoff intrazellulär in Tumorzellen deutlich erhöht [59,60]. Die Wirkstoffkonzentration ist damit intrazellulär etwa 10 bis 30 mal so hoch, während sie im Plasma deutlich verringert ist [59].

Alternativ wird auch die Mikroumgebung des Tumors als Ursache für eine Resistenzentwicklung diskutiert. Aufgrund der anti-angiogenetischen Therapie herrscht im Tumorgewebe aus Mangel an tumorversorgenden Blutgefäßen eine Hypoxie. Dies führt zu einem Anstieg von Progenitorzellen aus dem Knochenmark (Englisch: bone marrow-derived cells = BMDC), die die Neovaskularisation des Tumorgewebes vorantreiben können [9,149]. Durch eine erhöhte Dichte von Perizyten um tumorversorgende Blutgefäße kann die Stabilität und Funktion bereits existierender Blutgefäße verbessert werden, sodass sie von einer anti-angiogenetischen Therapie weniger stark beeinträchtigt werden [15,116]. Tumorgefäße, die von weniger Perizyten umhüllt sind, zeigen eine stärkere Einschränkung durch eine anti-angiogenetische Therapie [15]. Durch das „Perizyten-Recruitment“ kann die Vaskularisation des Tumors trotz VEGF-Blockade aufrechterhalten werden [15,16].

Eine weitere Erklärung für die Entwicklung einer Resistenz ist die Hochregulation anderer Pathways oder Proteine, um die Blockade der Rezeptortyrosinkinasen zu umgehen [143]. Die durch VEGFR und PDGFR stimulierten Signalwege für Proliferation, Migration und Überleben der Tumorzellen werden zusätzlich auch durch andere Proteine und Signalwege angesteuert. Indem diese alternativen Pathways vermehrt stimuliert werden, kann die funktionelle VEGFR- und PDGFR-Blockade umgangen, und die hemmenden Effekte auf die Tumorzellproliferation, -migration und das Tumorzellüberleben abgemildert oder aufgehoben werden [25].

Mutationen in den Endothelzellen als Ursache einer Resistenz gegen Tyrosinkinaseinhibitoren werden dahingegen als eher unwahrscheinlich erachtet [143]. Die primäre Zielstruktur der TKIs, der VEGF-Rezeptor, wird auf allen Tumorendothelzellen exprimiert. Eine Mutation müsste im VEGFR-Gen jeder Endothelzelle vorliegen, um eine Resistenz der gesamten Tumormasse hervorzurufen, was fast ausgeschlossen ist [143].

## 2.2 Extrazelluläre Vesikel

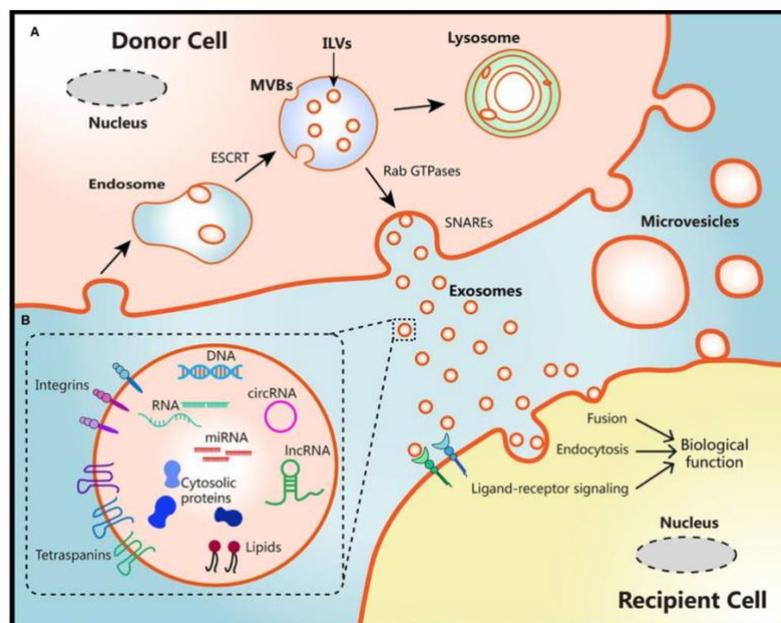
### 2.2.1 Aufbau und Synthese von extrazellulären Vesikeln

Extrazelluläre Vesikel sind Partikel mit einer Größe von 30 bis 5000 nm, die sowohl von körpereigenen als auch von Tumorzellen zur interzellulären Kommunikation sezerniert werden [79,166]. Der Begriff extrazelluläre Vesikel umfasst die großen extrazellulären Vesikel (150 bis 5000 nm), die auch als Mikrovesikel oder large extracellular vesicles (large EVs) bezeichnet werden, und die kleinen extrazellulären Vesikel (30 bis 150 nm), die auch als Exosomen oder small extracellular vesicles (small EVs) bezeichnet werden [137]. In dieser Arbeit wird der Begriff Exosomen verwendet, um kleine extrazelluläre Vesikel mit einer charakteristischen Größe von 30 bis 150 nm zu beschreiben.

Exosomen werden aktiv gebildet und durch das endosomale System prozessiert, wohingegen Mikrovesikel durch Abschnürungen der Plasmamembran entstehen (Abb. 10) [166].

Frühe Endosomen werden auch als multivesikuläre Körper (Englisch: multivesicular Body, MVB) oder multivesikuläre Endosomen (MVE) bezeichnet [166]. Während der Reifung der MVEs werden Teile der MVE-Membran nach innen abgeschnürt, sodass so genannte intraluminal Vesikel (ILV) entstehen [108,137]. Nach Reifung der MVEs werden bei Verschmelzung der MVE-Membran mit der Zellmembran die ILVs, dann Exosomen genannt, aus der Zelle freigesetzt. Im Falle einer Verschmelzung des reifen MVEs mit einem Lysosom kommt es zur Destruktion des MVEs und der enthaltenen ILVs [3].

**Abbildung 10:** Synthese und Sekretion von Exosomen  
modifiziert nach [137]



Für die Synthese von Exosomen sind zwei Prozesse essentiell. Bestandteile dieser Prozesse dienen als so genannte exosomale Marker zur Identifizierung oder Definition von Exosomen [3]. Dazu zählen die Tetraspanine CD9 und CD63 sowie das Protein Alix [89,168].

Alix verbindet verschiedene Bestandteile eines Komplexes, der für das Ausknospen der EV-Membran zuständig ist [3]. Von diesem Komplex, der endosomal sorting complex required for transport (ESCRT), gibt es verschiedene Untergruppen, die primär das Abschnüren der EV-Membran (ESCRT I und II) oder das Fertigstellen der Abschnürung (ESCRT III) antreiben. Alix verbindet ESCRT I und II mit ESCRT III und stellt somit ein Marker für Exosomen dar.

Tetraspanine bestehen aus jeweils vier Transmembranproteinen, die durch variable Bindeglieder miteinander verbunden sind [3]. Die Variabilität der Bindeglieder definiert spezifische Interaktionen zwischen Proteinen, die für das Ausknospen der IVL-Membran zuständig sind. Auf der Membran der Endosomen gibt es Regionen, die eine hohe Dichte an Tetraspaninen besitzen und daher tetraspanin enriched microdomains (TEM) genannt werden. Durch die TEMs werden Proteine, die für die IVL-Knospung gebraucht werden, mithilfe der Protein-Protein-Interaktionen organisiert. Zwei wichtige Tetraspanine für die Synthese von IVLs sind CD9 und CD63, die daher als exosomale Marker dienen können.

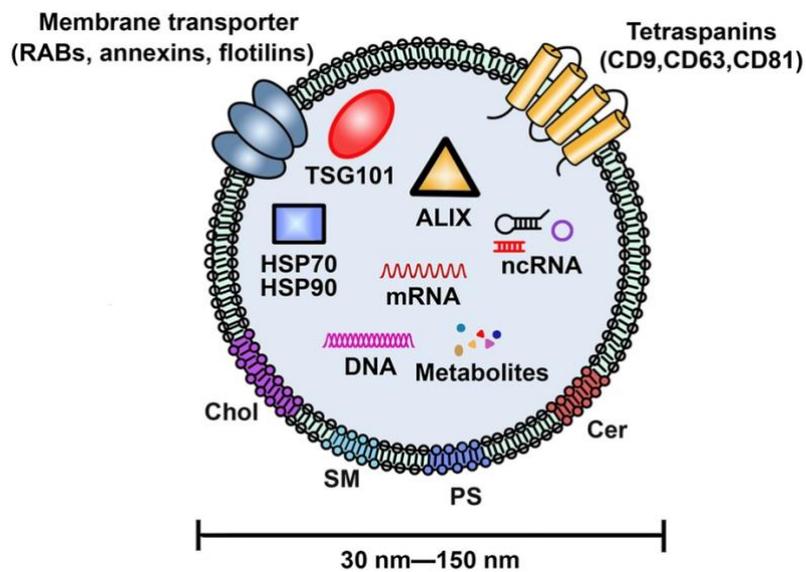
Exosomen werden umhüllt von einer Doppellipidschicht und können eine Vielzahl an Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten und Nucleinsäuren beinhalten (Abb. 11) [178].

Beispiele für häufig vertretene exosomale Proteine sind Alix, TSG101, Hitzeschockproteine wie HSP70, Proteinkinasen und G-Proteine, die Tetraspanine CD9, CD63, CD81 und Oberflächenantigene der Klasse MHC I und II [117]. Enzyme aus dem Zellstoffwechsel, wie GAPDH, sind ebenfalls in den Exosomen zu finden [117].

Lipide spiegeln generell die Lipidkomposition der Ausgangszelle wieder, wobei einige Lipide jeweils vermehrt in Exosomen zu finden sind [2]. Für Glycosphingolipide, Spingomyelin, Cholesterin und Phosphatidylserin konnte gezeigt werden, dass sie in Exosomen angereichert sind [110].

In geringen Anteilen enthalten Exosomen DNA, wie genomische und mitochondriale DNA [2,64,170]. Der Großteil der Nucleinsäuren in Exosomen stellen allerdings kleine RNAs dar [2]. Dazu zählen messenger RNA (mRNA), micro RNA (miRNA), ribosomale RNA (rRNA), lange und kurze non-coding RNA, transfer-RNA-Fragmente (tRNA), piwi-interacting RNA, vault RNA und Y RNA [2]. Im Vergleich zu der Gesamt-RNA der Exosomen stellen miRNA und tRNA-Fragmente anteilig etwa 15% dar [14,178]. Die Menge der enthaltenen RNA in Exosomen ist von der Ursprungszelle abhängig [178].

**Abbildung 11:** Aufbau und Zusammensetzung von Exosomen  
modifiziert nach [108]



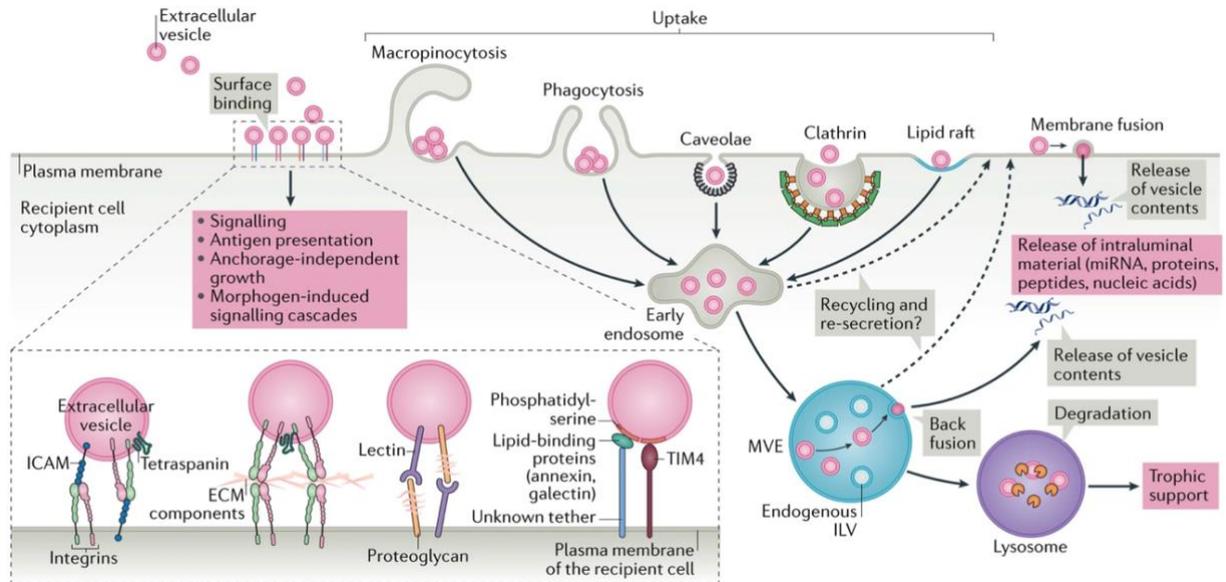
Die Aufnahme von Exosomen in eine Empfängerzelle kann über verschiedene Mechanismen erfolgen (Abb. 12) [166]. Abhängig von unterschiedlichen Oberflächenantigenen der Exosomen können sie in die Zelle aufgenommen werden oder an der Oberfläche der Zelle anhaften bleiben [166]. Mögliche Mechanismen zur Aufnahme von Exosomen in die Zelle sind Clathrin-abhängige Endozytose oder Clathrin-unabhängige Endozytoseformen, wie Makropinozytose, Phagozytose, oder Endozytose mittels Caveolae oder Lipid Rafts [2,43,126,159,166].

Im Rahmen der Clathrin-abhängigen Endozytose verformen Clathrin-umhüllte Vesikel die Zellmembran, die dann nach intrazellulär aussprosst, reift und sich von der Zellmembran löst [126]. Die Clathrin-ummantelten Vesikel werden dann durch Uncoating von Clathrin gelöst und fusionieren mit dem Endosom, wo der Inhalt der Vesikel freigegeben wird [94,126].

Bei der Phagozytose wird eine Rho-GTPase-vermittelte Signalkaskade aktiviert, die Aktin dazu stimuliert sich an der Zelloberfläche abzusammeln [34,67]. Das Aktin bildet dann Ausstülpungen der Zellmembran, die die Exosomen faustschlussartig umhüllen und in die Zelle aufnehmen [34].

Eine Aufnahme von Exosomen durch Makropinozytose wird ebenfalls durch eine Rho-GTPase-vermittelte Signalkaskade gesteuert [34]. Hier werden die Exosomen allerdings nicht durch die Ausstülpungen der Zellmembran umfasst, sondern durch eine große Aktin-vermittelte Ausbuchtung der Zellmembran bedeckt, die über den Exosomen zusammenfällt und sie so einschließt [166]. Die Ausbuchtung der Zellmembran fusioniert dann mit der Zellmembran, um ein endozytotisches Vesikel zu bilden, mit dem größere Mengen an Exosomen aufgenommen werden können.

**Abbildung 12:** Aufnahme von Exosomen in die Empfängerzelle  
modifiziert nach [166]



Caveolae sind kleine Invaginationen der Zellmembran, die mit dem Protein Caveolin ausgekleidet sind [34]. Caveolin ist essentiell für die Ausbildung der Caveolae: Durch Oligomerisation des Caveolins wird die Bildung von Caveolin-angereicherten Rafts der Zellmembran angeregt [40]. Nach einer Aktivierung der Caveolae werden die Membraninvaginationen zusammen mit den enthaltenen Vesikeln in die Zelle aufgenommen [34,126].

Lipid Rafts sind spezielle Regionen der Zellmembran mit einer veränderten Phospholipidzusammensetzung [126]. Clathrin-unabhängige Endozytose ist von Cholesterin abhängig, sodass in den Bereichen der Caveolae und Lipid Rafts Cholesterin angereichert ist [126]. Rafts können in den Membraninvaginationen gefunden werden, die durch Caveolin oder das Protein Flotillin gebildet werden. Flotillin vermittelt eine Caveolin- und Clathrin-unabhängige Endozytose [55,126].

Die in den Exosomen enthaltenen Komponenten werden nach Aufnahme in die Empfängerzellen freigesetzt.

### 2.2.2 Funktionen von extrazellulären Vesikeln

Exosomen spiegeln einen Teil der Zelle wieder, aus der sie sezerniert wurden und sind in allen Körperflüssigkeiten, wie Blut, Urin, Speichel, Aszites, Liquor und Muttermilch nachweisbar [108,168]. Sie können Proteine, Lipide, DNA, mRNA und nicht-kodierende Nucleinsäuren, wie miRNA, transportieren [168,178]. Der Inhalt der Exosomen ist dabei nicht nur vom Zelltyp, sondern auch vom Ursprung der Zelle abhängig [44,92]. Im Gegensatz zu der früheren

Hypothese, extrazelluläre Vesikel würden nur dazu dienen, fehlgefaltete Proteine und weiteren Zellschrott aus den Zellen zu befördern, wurden den EVs in den letzten Jahren zahlreiche Funktionen zugeschrieben [168].

Extrazelluläre Vesikel dienen der Zell-Zell-Kommunikation. Dies funktioniert über einen Transport von Molekülen innerhalb der Vesikel, die die Physiologie einer Zelle beeinflussen können [108,168]. Das Ausmaß und die Bedeutung der Zell-Zell-Kommunikation über exosomalen Transport wird derzeit noch ausgiebig erforscht und diskutiert.

Eine mögliche Bedeutung der exosomalen interzellulären Kommunikation ist die Immunregulation. Beispielsweise wurde eine Expression des Programmed Cell Death Receptor-Liganden 1 (PD-L1) auf Exosomen eines Melanoms nachgewiesen, was zu einer Immunsuppression im Sinne einer verminderten T-Zell-Reaktion auf Tumorzellen führen kann [27].

Zusätzlich kann durch Transport von RNA in Exosomen die Produktion von Proteinen in Empfängerzellen moduliert werden, über eine spezifische Rezeptor-Liganden-Bindung kann so auch ein gezielter Transport erfolgen [162]. Die hohe Spezifität der Rezeptor-Liganden-Interaktion könnte auch eine Kommunikation zwischen Zellen ermöglichen, die im Körper weit voneinander entfernt liegen [168].

Die erhöhte Konzentration von miRNAs in Exosomen im Vergleich zur miRNA-Konzentration der Ursprungszelle lässt auf eine gezielte Verpackung von miRNA in Exosomen schließen [162]. In Kombination mit einer spezifischen Ansteuerung der Zielzellen über Rezeptor-Liganden-Interaktion kann so die Genexpression aller Zielzellen in einem kurzen Zeitraum geändert werden [168].

### 2.2.3 Rolle von extrazellulären Vesikeln bei der Entwicklung einer Therapieresistenz

Die Verschickung von miRNAs mittels Exosomen wird auch als Möglichkeit zur Resistenzentwicklung gegen Chemotherapien diskutiert [11].

Der Mechanismus des interzellulären Austauschs über Exosomen kann von medikamentenresistenten Tumorzellen möglicherweise auch genutzt werden, um die z.T. genetische Information der Resistenz an andere Tumorzellen weiterzugeben [35]. Durch den exosomalen Transport von Proteinen wie dem P-Glykoprotein, die bei Resistenzmechanismen eine Rolle spielen, kann die Therapieresistenz weitergegeben werden. Der Transport von P-Glykoprotein in Exosomen wurde beispielsweise bei medikamentenresistenten Mammakarzinom-Zellen nachgewiesen [114].

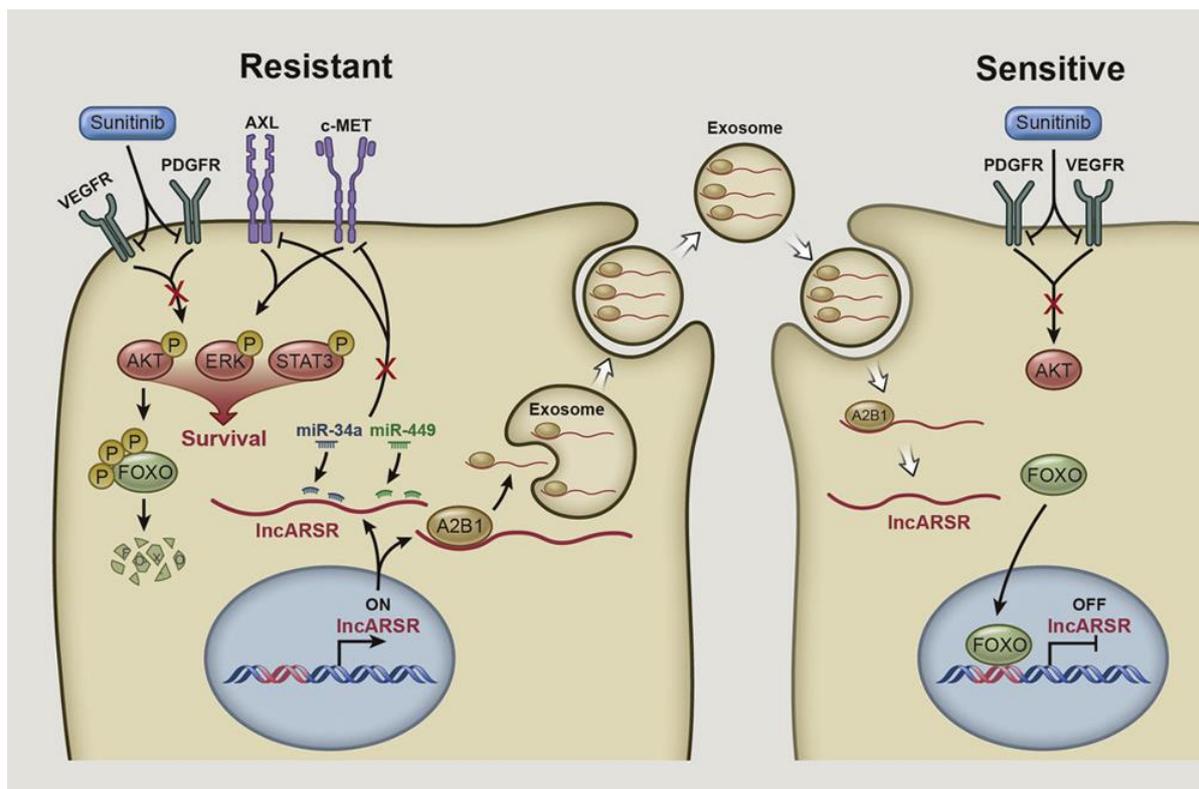
Medikamentenresistente Tumorzellen können über die Verpackung von Chemotherapeutika in so genannte tumor-derived exosomes (TDE) die Wirkstoffkonzentration im Tumorgewebe erheblich senken [145].

Für das Mammakarzinom wurde ebenfalls nachgewiesen, dass Exosomen, die von Tamoxifen-resistenten Tumorzellen sezerniert wurden, bei Tumorzellen eine Chemotherapieresistenz verstärken können [172].

In Bezug auf das Nierenzellkarzinom konnte für die Resistenz gegen den Tyrosinkinaseinhibitor Sunitinib gezeigt werden, dass eine Therapieresistenz über lange nicht-kodierende RNA (lncRNA) vermittelt wird (Abb. 13) [140].

Die lncRNA, in diesem Fall lncARSR (lncRNA Activated in RCC with Sunitinib Resistance) genannt, wird in Sunitinib-resistenten Zellen im Vergleich zu Sunitinib-sensitiven Zellen vermehrt gefunden. Über eine kompetitive Bindung der miRNA-34 und miRNA-449 werden AXL/c-MET hochreguliert, was zu einer konsekutiven Aktivierung der STAT3, AKT, und ERK-Signalwege führt. Diese Signalwege fördern das Wachstum, das Überleben und die Stoffwechselfunktionen von Tumorzellen [7,118]. Es wurde nachgewiesen, dass die Resistenz über exosomalen Transport von lncARSR auf sensitive Zellen übertragen werden kann [140].

**Abbildung 13:** Übertragung der Sunitinib-Resistenz durch exosomalen Transport von lncARSR modifiziert nach [140]



### 3. Zielstellung

Das Nierenzellkarzinom ist eine der zehn häufigsten Tumorerkrankungen in Deutschland [53]. Obwohl der Großteil der Neudiagnosen in frühen Tumorstadien gestellt werden, befinden sich 16 bis 20% der erstdiagnostizierten Nierenzellkarzinompatienten bereits im metastasierten Tumorstadium IV nach UICC [53]. Im Tumorstadium IV ist die Prognose schlecht, die 5-Jahres-Überlebensrate fällt von 75% im Tumorstadium III auf 15 bis 17% im Tumorstadium IV ab [53]. Eine gezielte systemische Therapie ist daher von enormer Bedeutung für eine Verbesserung der Prognose. Leider entwickeln nahezu alle Patienten nach durchschnittlich 6 bis 15 Monaten eine Therapieresistenz gegen die anti-angiogenetischen Medikamente [143]. Ein dauerhafter Therapieerfolg konnte deshalb bisher nicht erzielt werden.

Das Ziel dieser Dissertation ist es, zu klären, ob Exosomen die Resistenz gegen den Tyrosinkinaseinhibitor Pazopanib vermitteln können.

Dabei sollten folgende Aufgabenstellungen bearbeitet werden:

1. Bestätigung der Resistenz gegen Pazopanib in der Zelllinie 786-O nach Langzeitbehandlung
2. Isolation und Charakterisierung der Exosomen von Pazopanib-sensitiven und Pazopanib-resistenten 786-O-Zellen
3. Nachweis der Aufnahme von Exosomen resistenter 786-O-Zellen in sensitiven Zellen
4. Analyse der Effekte der Exosomen resistenter 786-O-Zellen auf die Zellviabilität sensitiver Zellen

Die Ergebnisse dieser Dissertation sollen als Teil eines größeren Projekts dazu beitragen, die Mechanismen der Resistenzentwicklung besser zu verstehen. Zusammen mit den Ergebnissen drei weiterer Promotionsarbeiten soll die Frage geklärt werden, ob eine Resistenzübertragung über Exosomen ein alternativer Mechanismus für eine Resistenzentwicklung darstellt. Über das bessere Verständnis der Resistenzmechanismen kann dies auch einen neuen Ansatz für die Entwicklung von Biomarkern und neuen therapeutischen Ansätzen darstellen.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Lösungen und Medien für die Zellkultur

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RPMI-1640	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypsin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DPBS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypanblau-Lösung, 0.4%	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
WST-1 cell proliferation reagent	Roche Life Science, Penzberg, Deutschland
DMSO Research Grade	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pazopanib HCl (10 mM in 1 ml DMSO)	Selleckchem, Houston, USA

#### 4.1.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>		<b>Hersteller</b>
Pipettenspitzen	Ultratip 0,1 - 10 µl, 10 - 200 µl, 100 - 1200 µl	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
	Sapphire Filterspitze 10 µl, 100 µl	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
	MultiTray® Ratiolab	Ratiolab, Dreieich, Deutschland
Serologische Pipetten	1 ml, 2 ml	Corning, New York, USA
	5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pasteurpipetten	Disposable Glass Pasteur Pipettes 230 mm	VWR International, Radnor, USA
	Disposable Glass Pasteur Pipettes 150 mm	VWR International, Radnor, USA
Reaktionsgefäße	Eppendorf Tubes® 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Rundbodenzentrifugenröhrchen 12 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
	CELLSTAR® Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Ultrazentrifugenröhrchen	Bottle Polycarbonate, 26,3 ml	Beckman Coulter, Brea, USA
	Cap + O-Ring for Polycarbonate 26,3 ml	Beckman Coulter, Brea, USA
Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup> und 75 cm <sup>2</sup>	CELLSTAR® TC Zellkulturflaschen mit Filterschraubverschluss	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturflasche 500 cm <sup>2</sup>	Nunc™ TripleFlask™ Treated Cell Culture Flasks	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Filter	Stericup-GP 0,22 µm, 250 ml	Merck, Darmstadt, Deutschland
Petrischale	Easy Grip Tissue Culture Dish	Corning, New York, USA
12-Well-Mikrotiterplatte	Corning® Costar® TC-behandelte Multiwellplatten	Corning, New York, USA
96-Well-Mikrotiterplatte	Falcon™ Tissue Culture Plate, 96 Well	Corning, New York, USA
Objekträger	4-Well-Objekträger	Corning, New York, USA
Spitzen für Stepper	Combitips® advanced	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

#### 4.1.3 SDS-Page und Immunoblotting

<b>Material</b>		<b>Hersteller</b>
Milchpulver	Skim Milk Powder for blotting	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
BSA	Bovine Serum Albumine	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Tween 20		SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tris	10x Tris/Glycine/SDS	Biorad, Hercules, USA
Natriumchlorid	Sodium Chloride Tris electrophoresis grade	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Protease-Inhibitor-Cocktail	cOmplete™ -ULTRA-Mini-Tabl., Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche Life Science, Penzberg, Deutschland
Marker	PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Blotting Membrane PVDF	Serva Fluorobind Membrane Surface PVDF Pore Size 0,2 µm	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Polyacrylamidgel	Mini PROTEAN TGX Gel 4-15%	Biorad, Hercules, USA
Laufkammer	Biorad Mini-PROTEAN 3 Cell	Biorad, Hercules, USA
Chemolumineszenz	Pierce ECL Western Blotting Substance	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

#### 4.1.4 Antikörper

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Primärantikörper</b>	
α-CD81	Abcam, Cambridge, Großbritannien
α-CD63	JSR Life Sciences, Sunnyvale, USA
α-GAPDH	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
α-Syntenin	Abcam, Cambridge, Großbritannien
α-Axl	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
α-Met	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
α-GM130	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
<b>Sekundärantikörper</b>	
α-Mouse	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
α-Rabbit	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

#### 4.1.5 Allgemeine Puffer und Lösungen

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Menge</b>
Lysepuffer 1X Tris-Triton-Puffer pH 7.4 (für Plasmamembran- und Zytoskelettproteine)  Aliquotieren des Lysepuffers und Aufbewahrung bis zur weiteren Verwendung bei -20°C	TRIS pH 7,6 NaCl CHAPS SDS TritonX-100	50 mM 150 mM 1% 0,1% 1%
10X Protease-Inhibitor-Cocktail	Protease-Inhibitor-Cocktail dH <sub>2</sub> O	1 Tablette 10 ml
Complete Lysis Buffer	1X Tris-Triton Puffer pH 7.4 1X Tris-TritonX-100 10X Protease-Inhibitor-Cocktail	2 ml Lösung 180 µl 20 µl
10X TBsT (Tris buffered Saline Tween 20) pH 7,6	dH <sub>2</sub> O NaCl 1,5 M Tris 200 mM, pH 7,6 Tween 20 (dH <sub>2</sub> O)	1 Liter 88 g 24.2 g 10 ml Auffüllen (finales Volumen 1 Liter)
10X Laufpuffer	Tris 250 mM Glycin 1,9 M SDS 1% dH <sub>2</sub> O	30,27 g 144 g 10 g
5% Milch	TBsT Skim milk powder	100 ml 5 g
5% BSA (Bovine serum albumine)	TBsT BSA powder	100 ml 5 g
1X Transferpuffer	Glycin Tris SDS Methanol 15%	39 mM 48 mM 0,01% 150 ml
1X PBS 0,1% Triton X (PBST)	PBS Triton X	100 ml 100 µl

1X Blockierpuffer	PBST	10 ml
	BSA 3%	0,3 g
Paraformaldehyd 4% in PBS (methanolfrei)	1X PBS	9,6 ml
	PFA	0,4 ml

#### 4.1.6 Fluoreszenzmarkierung von Exosomen

<b>Material</b>		<b>Hersteller</b>
PKH26	PKH26 Red Fluorescence Cell Linker Midi Kit for general cell membrane labeling	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Diluent C	Diluent C for Membrane Labeling	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Phalloidin	Phalloidin iFluor488	AAT Bioquest, Sunnyvale, USA
Antibody Diluent	Dako Antibody Diluent	Agilent, Santa Clara, USA
Paraformaldehyd reinst		Merck, Darmstadt, Deutschland
Dapi	VECTASHIELD HardSet Antifade Mounting Medium with DAPI	Vector Labs Inc., Burlingame, USA
Deckgläser	High Precision Deckgläser 24x60 mm, MEDITE	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Pierce™ Protein Concentrator 100k	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

#### 4.1.7 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
--------------	--------------------	-------------------

Pipettierhilfe	Pipetboy	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Absaughilfe	Vacunsafe, Vacuboy	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Pipetten	2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson Inc., Middleton, USA
	2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 5000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mehrkanalpipette	Transferpette® 20 - 200 µl	Brand, Wertheim, Deutschland
Stepper	Multipette®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Eppendorf mini spin plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultrazentrifuge	Optima LE-80K Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Brea, USA
Mikroskop	Axiovert S100 Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Tecan infinite F200 pro	Tecan, Männedorf, Schweiz
Zellzähler	Luna II automated cell counter	Logos Biosystems, Anyang-si, Südkorea
Slides für Zellzähler	Luna cell counting slides	Logos Biosystems, Anyang-si, Südkorea
Brutschrank	Hera Cell Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Sterilwerkbank	Hera Safe Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Einfrierbox	Corning® CoolCell™ LX Cell Freezing Container	Corning, New York, USA
Intas Imager	ECL Chemocam Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Feinwaage	VWR Science Education	VWR International, Radnor, USA
Laserscanning-Mikroskop	LSM 780	Carl Zeiss AG, Wetzlar, Deutschland

## 4.2 Methoden

## 4.2.1. Allgemeine Zellkulturmethoden

### 4.2.1.1 Zelllinie

Die verwendete Zelllinie 786-O wurde auf Basis der Tumorzellen des klarzelligen Nierenzellkarzinoms eines 58-jährigen kaukasischen Mannes etabliert. 786-O zeigt in der Zellkultur ein adhärentes Wachstum und weist eine Von-Hippel-Lindau-Mutation (= VHL) vor. VHL ist eines der wichtigsten Tumorsuppressorgene und bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen oftmals mutiert. Daraus resultiert auch eine Veränderung des Hypoxie-induzierten Faktors sowie des VEGF-Rezeptors bei 786-O-Zellen. Die Zellen wurden für die Dauer des Experiments kontinuierlich mit DMEM und RPMI-1640 im Verhältnis 1:1 und 10% fetalem Kälberserum kultiviert.

Die unbehandelten Zellen werden im Folgenden als 786-O<sup>WT</sup> (Wildtyp) bezeichnet.

### 4.2.1.2 Etablierung der Pazopanib-resistenten Zellen

Um bei der Zelllinie 786-O eine Resistenz gegen den Tyrosinkinaseinhibitor Pazopanib zu induzieren, wurden 786-O-Zellen durch die Arbeitsgruppe von Dr.rer.nat. Bozhena Vynnytska-Myronovska über eine Dauer von 3 Monaten mit Pazopanib in einer Konzentration von 14 µM behandelt. Die Überwachung der Zellviabilität erfolgte regelmäßig alle 2 bis 3 Wochen sowohl durch Zellzählung als auch mit WST-1-Assays. Nach Ablauf der 3 Monate erfolgte ein Wash-Out, währenddessen die Zellen nicht mehr chronisch mit Pazopanib behandelt wurden. Auch hier erfolgte die Überwachung der Zellviabilität weiterhin alle 2 bis 3 Wochen. Die Pazopanib-resistenten Zellen werden im Folgenden als 786-O<sup>PR</sup> bezeichnet. Bei der Planung und Durchführung der Experimente wurde darauf geachtet, dass 786-O<sup>WT</sup> und 786-O<sup>PR</sup> parallel jeweils die gleiche Passage hatten, um Effekte durch Zellalterung zu minimieren.

Zu Beginn der Experimente wurden sowohl Zellen von 786-O<sup>WT</sup> als auch von 786-O<sup>PR</sup> vermehrt, um einen Vorrat an 786-O-Zellen anzulegen (= Zellstock). Bei 95-prozentiger Konfluenz der 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen wurden die Zellen eingefroren. So konnte sichergestellt werden, dass für alle Experimente Zellen ähnlicher Passage verwendet werden können, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleisten zu können.

Für jedes Experiment wurden Zellen der Passage 57 aufgetaut und dann für einige Wochen kultiviert, sodass die Zellen sich von den Effekten der Kryokonservierung regenerieren konnten. Alle Experimente wurden innerhalb der Passagen 61 bis 68 durchgeführt. Sobald die Experimente beendet waren und die Zellen in ihrer Passage zu hoch waren, wurden die Zellkulturflaschen verworfen und neue Zellen aus dem Zellstock aufgetaut.

#### 4.2.1.3 Subkultivieren adhärenter Zellen in der Zellkultur

Abhängig von der Wachstumsfläche der Zellkulturflaschen wurden unterschiedliche Volumina verwendet (Tab. 12).

**Tabelle 12:** Verwendete Volumina je nach Wachstumsfläche

	<b>25 cm<sup>2</sup></b>	<b>75 cm<sup>2</sup></b>	<b>500 cm<sup>2</sup></b>
PBS	4 ml	5 ml	20 ml
Trypsin	2 ml	2 ml	15 ml
Resuspension mit DMEM/RPMI +10% FCS	3 ml	5 ml	30 ml
Zellzählung	3 ml	5 ml	10 ml
Endvolumen	4,5 ml	12 ml	80 ml
Stock 1 (finale Konz. 14µM)	630 µl	1680 µl	11200 µl

Sobald die Zellen eine Konfluenz von 90-95% erreicht hatten, wurde das verbrauchte Medium mit einer Glaspasteurpipette abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, um Zelldetritus und Reste des Zellkulturmediums zu entfernen. Anschließend wurde das PBS ebenfalls mit einer Glaspasteurpipette abgesaugt und Trypsin auf die Zellen gegeben, um die adhären wachsenden Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen. Die Zellkulturflaschen wurden dann bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 10 bis 15 Minuten inkubiert, bis die Zellen sich komplett vom Flaschenboden gelöst hatten. Die Reaktion des Trypsins wurde durch Zugabe von Zellkulturmedium DMEM/RPMI +10% FCS gestoppt und die Zellen in ein 12 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde für 3 Minuten bei 1100 g zentrifugiert, um abgestorbene Zellen und Zellreste zu entfernen. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde der Zellkulturüberstand mit einer Glaspipette abgesaugt, das Zellpellet verblieb am Boden des Zentrifugenröhrchens. Die Zellen wurden mit DMEM/RPMI +10% FCS resuspendiert und anschließend eine Zellzählung durchgeführt. Bei 786-O<sup>WT</sup> wurde die entsprechende Menge Zellkulturmedium in die Zellkulturflaschen gegeben (Tab. 13) und dann die berechnete Menge Zellsuspension in das vorgelegte Medium pipettiert. Bei 786-O<sup>PR</sup> musste aufgrund der gleichbleibenden Medikamentenkonzentration von 14 µM das Endvolumen ohne Medikament jeweils genau 3870 µl betragen (bei 25 cm<sup>2</sup>). Die Menge an Zellkulturmedium wurde wie folgt berechnet:

$$3870 \mu\text{l} - \text{berechnete Menge Zellsuspension} [\mu\text{l}] = \text{Menge an Zellkulturmedium} [\mu\text{l}]$$

Die berechnete Menge an Zellkulturmedium wurde dann in die Zellkulturflaschen vorgelegt. Nach dreimaliger Resuspension zur Durchmischung der Zellen wurde die berechnete Menge Zellsuspension ebenfalls in die Zellkulturflaschen pipettiert. 3 Stunden nach Aussaat der Zellen in die neuen Zellkulturflaschen wurde jeweils 630 µl Pazopanib-Stock 1 in die Flaschen gegeben, sodass das Endvolumen exakt 4500 µl (= 4,5 ml) und die finale Konzentration von Pazopanib 14 µM entsprach (Tab. 13).

**Tabelle 13:** Verwendete Volumina für Medium/Pazopanib Stock 1 je nach Wachstumsfläche

	<b>25 cm<sup>2</sup></b>	<b>75 cm<sup>2</sup></b>	<b>500 cm<sup>2</sup></b>
Medium + Zellsuspension	3870 µl	10 320 µl	68800 µl
Pazopanib Stock 1	630 µl	1680 µl	11200 µl
Endvolumen	4500 µl	12000 µl	80000 µl

#### 4.2.1.4 Kryokonservierung adhärenter Zellen

Die Zellen wurden zunächst aus der Zellkulturflasche gelöst. Die Zellsuspension wurde bei 1100 g für 3 Minuten zentrifugiert und das alte Medium abgesaugt. Das Zellpellet wurde dann zügig mit 2 ml DMSO resuspendiert, direkt in ein Kryogefäß überführt und umgehend auf Eis gestellt. Um die Zellen schonend einzufrieren wurde eine Einfrierbox verwendet. Die Proben wurden dann bei -80°C eingefroren und bis zur weiteren Verwendung gelagert. Um gleiche Bedingungen für Experimente zu schaffen, wurden sowohl 786-O<sup>WT</sup> als auch 786-O<sup>PR</sup> zu Beginn der Arbeitsphase in der Zellkultur vermehrt und dann in regelmäßigen Abständen bei -80°C eingefroren. Sobald die Zellen eine hohe Passagezahl erreicht hatten, wurden neue Zellen aufgetaut.

#### 4.2.1.5 Auftauen adhärenter Zellen

Um die Zellen schonend aufzutauen, wurden 9 ml DMEM/RPMI +10% FCS in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert. Mit einer gestopften Pasteurpipette wurde die angetaute Zellsuspension abgenommen und in das Zellkulturmedium pipettiert, um die zelltoxische Wirkung des DMSOs abzumildern. Wenn das gesamte Zellpellet aufgetaut und in das Zellkulturmedium überführt wurde, erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 3 Minuten bei 1100 g. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und das Zellpellet mit 5 ml DMEM/RPMI +10% FCS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann wiederholt für 3 Minuten bei 1100 g zentrifugiert, um mögliche Überreste des DMSOs auszuwaschen. Anschließend an den zweiten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand mit einer

ungestopften Pasteurpipette abgesaugt und das Zellpellet erneut mit 3 ml DMEM/RPMI +10% FCS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde, entsprechend der Wachstumsfläche der Zellen, vor der Kryokonservierung in eine Zellkulturflasche der Größe 25 cm<sup>2</sup> oder 75 cm<sup>2</sup> ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Medienwechsel. Die Gabe von Pazopanib bei chronisch behandelten 786-O<sup>PR</sup>-Zellen erfolgte auch am Tag nach dem Auftauen mit dem Medienwechsel.

#### 4.2.1.6 Zellzählung

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau (Verdünnung 1:1) in ein 0,5-ml-Eppendorf-Tube gegeben und durch mehrmaliges Pipettieren vermischt. Trypanblau wird als Farbstoff nicht von lebenden Zellen aufgenommen, da der Farbstoff die intakte Zellmembran nicht passieren kann. Deshalb sind letztlich nur tote Zellen gefärbt. Mit dieser Farbausschlussmethode kann dann die Zellzahl bestimmt werden.

Nach Mischung der Zellen mit Trypanblau wurden 10 µl der gefärbten Zellsuspension in ein Luna Cell Counting Slide pipettiert und die Zellen mithilfe des LUNA-II™ Automated Cell Counter gezählt. Anhand der Zellzahl wurde dann die Verdünnung berechnet, die benötigt wurde, um die vorher etablierte Zellzahl für die jeweiligen Wachstumsflächen aussäen zu können. Das Volumen der benötigten Zellsuspension wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{benötigte Zellsuspension [ml]} = \frac{\text{Konzentration lebender Zellen} \left[ \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} \right] \times \text{Resuspensionsvolumen [ml]}}{\text{gewünschte Konzentration} \left[ \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} \right]}$$

#### 4.2.1.7 WST-1-Assay

Mithilfe des WST-1-Assays kann die Zellviabilität photometrisch bestimmt werden. WST (Englisch: water soluble tetrazolium) ist ein Salz, das durch einen enzymatischen Komplex in der Atmungskette lebender Zellen zu Formazan umgesetzt wird. Der Farbumschlag des schwachroten WST in das dunkelrote Formazan kann dann in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und anschließend ausgewertet werden. Je höher die Zellviabilität der untersuchten Probe war, desto stärker war der Farbumschlag und umso stärker auch die gemessene Absorption.

WST-1-Assays wurden verwendet, um den Effekt einer Behandlung mit Pazopanib 14 µM sowohl auf 786-O<sup>WT</sup> als auch auf 786-O<sup>PR</sup>-Zellen zu untersuchen. Dazu wurden für jede, zu untersuchende Gruppe je 3 technische Replikate der Zelllinie in eine 96-Well-Platte ausgesät. Die 3 technischen Replikate wurden dann für 72 Stunden entweder mit Pazopanib 14 µM oder mit DMSO in der gleichen Konzentration behandelt.

Nach Ablauf der 72 Stunden wurde der Zellkulturüberstand abgeschüttet und mit einer Multipipette jeweils 100 µl DMEM/RPMI + 10% WST-1 in alle Wells pipettiert, in die auch Zellen ausgesät wurden. Zusätzlich wurde in eine Spalte, in der keine Zellen ausgesät wurden, auch jeweils 100 µl DMEM/RPMI + 10% WST-1 pipettiert, um den Leerwert der Platte bestimmen zu können (= Blank). Die Platte wurde für 60 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, dann erfolgte die erste photometrische Messung der Absorption mithilfe des TECAN-Readers. Sobald die erste Messung beendet war, wurde die Platte erneut für weitere 30 Minuten inkubiert, sodass insgesamt 90 Minuten nach Zugabe des WST-1 die zweite photometrische Messung erfolgen konnte.

#### 4.2.1.8 Etablierung der LC-50

Um die Konzentration von Pazopanib zu bestimmen, bei der die Zellviabilität von 786-O<sup>WT</sup> 50% beträgt, wurde ein Zellviabilitätsassay durchgeführt.

Dazu wurden 2 verschiedene 96-Well-Platten verwendet, in die jeweils biologische Replikate von 786-O<sup>WT</sup> und 786-O<sup>PR</sup> ausgesät wurden. Zuerst wurde mit einer Multipipette in jedes Well am Rand der Platte je 200 µl PBS pipettiert. Dann wurde ebenfalls mit einer Multipipette je 100 µl Zellkulturmedium in diejenigen Wells pipettiert, in die Zellen von 786-O<sup>WT</sup> und 786-O<sup>PR</sup> ausgesät werden sollten. Die jeweiligen Zelllinien wurden aus den Zellkulturflaschen gelöst und dann die Menge an Zellsuspension berechnet, die nötig war, um in jedes Well 1•10<sup>3</sup> Zellen aussäen zu können. Anschließend wurde mit einer Multipipette jeweils 100 µl Zellsuspension pro Well pipettiert und die 96-Well-Platte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 24 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden wurde mit einer Multikanalpipette aus jedem Well jeweils 100 µl Zellkulturüberstand abgenommen, der abgenommene Überstand wurde verworfen.

Um die dosisabhängigen Effekte von Pazopanib auf die Zellen zu untersuchen, wurden 786-O-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Pazopanib für eine Dauer von 72 Stunden behandelt. Nach Abnahme von jeweils 100 µl Zellkulturüberstand pro Well wurde mit einer Multipipette jeweils 100 µl unterschiedlicher Pazopanib-Konzentrationen in die entsprechenden Wells pipettiert und die Platte erneut bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert (Tab. 14).

**Tabelle 14:** *Verwendete Pazopanib-Konzentrationen und deren Zusammensetzung*

	<b>CTR-DMSO</b>	<b>Paz 7 µM</b>	<b>Paz 14 µM</b>	<b>Paz 18 µM</b>	<b>Paz 22 µM</b>
Medium	2490 µl	2150 µl	1800 µl	1600 µl	1400 µl

DMSO-Stock	10 µl	-	-	-	-
Pazopanib-Stock 1	-	350 µl	700 µl	900 µl	1100 µl

Die Zusammensetzungen der unterschiedlichen Pazopanib-Konzentrationen wurden unter Verwendung der unten genannten Formeln berechnet. Nach Abnahme von jeweils 100 µl des Zellkulturüberstands verbleiben 100 µl Zellkulturmedium in jedem Well. Bei Zugabe von 100 µl Pazopanib-Lösung wird das Medikament verdünnt, da sich bereits ein bestimmtes Volumen an Zellkulturmedium im Well befindet. Dieser Verdünnungseffekt wird in der Formel berücksichtigt, indem man die benötigte Konzentration verdoppelt. Durch die Mischung von 100 µl Zellkulturmedium in den Wells mit 100 µl Pazopanib-Stock wird so die finale gewünschte Konzentration erreicht.

Um Pipettierfehler gering zu halten, wurde jeweils 2500 µl der unterschiedlich konzentrierten Pazopanib-Lösungen angesetzt. Die verwendeten Konzentrationen umfassten sowohl die bisher verwendete Konzentration in der Langzeitkultur (14 µM), sowie eine niedrigere und jeweils zwei höhere Konzentrationen. Die Konzentration der verwendeten DMSO-Kontrolle entsprach der niedrigsten verwendeten Pazopanib-Konzentration (7 µM).

Die benötigte Menge des Pazopanib-Stock 1 für jede Konzentration wurde entsprechend folgender Formel berechnet:

$$\text{Pazopanib – Stock 1 [ml]} = \frac{(\text{benötigte Konzentration } [\mu\text{M}] \times 2) \times 2500 \mu\text{l}}{\text{Konzentration Pazopanib – Stock 1 } [\mu\text{M}]}$$

Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Konzentration des Pazopanib-Stock 1 100 µM beträgt. Die zu verwendende Menge des Zellkulturmediums wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellkulturmedium [ml]} = 2500 \mu\text{l} - \text{Pazopanib – Stock 1 [ml]}$$

Entsprechend der Berechnungen wurden dann die verschiedenen Pazopanib-Konzentrationen und die DMSO-Kontrolle angesetzt und mithilfe einer Multipette jeweils 100 µl pro Well pipettiert (Abb. 14).

Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde ein WST-1-Assay durchgeführt.

**Abbildung 14:** Belegung der 96-Well-Platte (Etablierung der LC50)

	DMSO	Paz 7 $\mu$ M	Paz 14 $\mu$ M	Paz 18 $\mu$ M	Paz 22 $\mu$ M						
786-O WT											
786-O WT											
786-O WT											
786-O Paz											
786-O Paz											
786-O Paz											

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Microsoft Excel. Um aus den gemessenen Absorptionswerten die Zellviabilität zu berechnen, wurden zwei Standardisierungen verwendet. Zuerst wurde der Mittelwert der Absorption der 3 technischen Replikate berechnet. Die erste Standardisierung betrachtete die mit Pazopanib behandelten Zellen jeweils im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe.

$$\% \text{ Zellviabilität (DMSO)} = \frac{\text{Mittelwert Absorption von Pazopanib-behandelten Zellen}}{\text{Mittelwert Absorption von DMSO-behandelten Zellen}}$$

Die zweite Standardisierung betrachtete die mit Pazopanib behandelten Zellen jeweils im Vergleich zu 786-O<sup>WT</sup>-Zellen, die nur mit DMSO 14  $\mu$ M behandelt worden waren.

$$\% \text{ Zellviabilität (WT-DMSO)} = \frac{\text{Mittelwert Absorption von Pazopanib-behandelten Zellen}}{\text{Mittelwert Absorption von DMSO-behandelten WT-Zellen}}$$

## 4.2.2. Exosomenisolation

### 4.2.2.1 Zellkultur

Die Exosomen wurden aus dem Zellkulturüberstand von 786-O<sup>WT</sup> und 786-O<sup>PR</sup> isoliert. An Tag 1 wurden jeweils  $3 \cdot 10^5$  Zellen in eine Zellkulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 500 cm<sup>2</sup> ausgesät. Sobald die Zellen eine Konfluenz von etwa 40% erreicht hatten (bei 786-O<sup>WT</sup> an Tag 4, bei 786-O<sup>PR</sup> an Tag 5), wurde das normale DMEM/RPMI +10% FCS abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden dann drei Mal mit jeweils 25 ml PBS gewaschen, um Zelldetritus und Reste des Zellkulturmediums zu entfernen. Anschließend wurde jeweils 80 ml DMEM/RPMI +10% Exosomen-depletiertes FCS in die Zellkulturflasche gegeben und die Zellen für 72 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bis sie eine Konfluenz von etwa 95-100% erreicht hatten.

### 4.2.2.2 Herstellung des Exosomen-depletierten fetalen Kälberserums (FCS)

Für die Herstellung des Exosomen-depletierten FCS wurde das fetale Kälberserum in jeweils acht Ultrazentrifugenröhrchen abgefüllt und für 24 Stunden bei 100.000 g zentrifugiert. Das dabei entstandene Pellet aus extrazellulären Vesikeln, Lipoproteinen und anderen Serumbestandteilen des fetalen Kälberserums wurde verworfen. Mithilfe eines Sterifilter-Systems wurde das zentrifugierte und nun Exosomen-depletierte FCS gefiltert, um einer Verunreinigung durch Bakterien vorzubeugen. Filtriertes ED-FCS wurde dann in 50 ml-Zentrifugenröhrchen abgefüllt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Durch die Verwendung des Exosomen-depletierten FCS zur Kultivierung der Zellen für die Exosomenisolation konnte sichergestellt werden, dass in der finalen Exosomenprobe ausschließlich Exosomen enthalten waren, die von 786-O-Zellen produziert wurden. So wurde der Einfluss von Exosomen fremden Ursprungs auf die Resistenzübertragung minimal gehalten.

### 4.2.2.3 Differentielle Zentrifugation

Nach 72 Stunden Inkubationszeit wurde der Zellkulturüberstand in 6 verschiedene 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4°C für 20 Minuten bei 2000 g zentrifugiert, um tote Zellen und Zellüberreste aus dem Zellkulturüberstand zu entfernen. Der einmalig zentrifugierte Zellkulturüberstand wurde dann in 6 neue 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, das Pellet aus Zelldetritus wurde verworfen.

Im Anschluss erfolgte ein zweiter Zentrifugationsschritt bei 4°C für 30 Minuten bei 15.000 g, um das Zellkulturmedium weiter zu reinigen und auch kleinere Zellbestandteile, die beim ersten Zentrifugationsschritt nicht entfernt wurden, aus dem Medium zu beseitigen.

Nach dem zweiten Zentrifugationsschritt wurde der Zellkulturüberstand dann in neue 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, der Zelldetritus wurde abermals verworfen. Das Medium, nun von Zelldetritus gereinigt, wurde dann bis zur Weiterverwendung bei 4°C aufbewahrt.

Für funktionelle Assays wurde das Zellkulturmedium vor der Ultrazentrifugation durch ein Sterilfilter-System gefiltert, um bakterieller Verunreinigung vorzubeugen.

#### 4.2.2.4 Ultrazentrifugation

Um die Exosomen aus dem bereits zentrifugierten Zellkulturüberstand zu isolieren, wurden jeweils 8 Ultrazentrifugenröhrchen pro Zentrifugationsschritt befüllt. Alle Röhrchen mussten dabei bis auf eine Nachkommastelle das gleiche Gewicht haben (56,0 g). Zur Ultrazentrifugation wurde die Ultrazentrifuge Optima LE-80K von Beckman Coulter in Kombination mit einem Rotor des Typs Ti70 verwendet. Die Zentrifugation erfolgte für 90 Minuten bei 40.000 g und einer Temperatur von 4°C. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand abgegossen und verworfen. Die Exosomenpellets der einzelnen Röhrchen wurden mit je 1000 µl PBS resuspendiert und in einem neuen Röhrchen vereint. Das fehlende Volumen wurde mit PBS aufgefüllt und die Probe dann erneut bei 4°C für 90 Minuten bei 40.000 g zentrifugiert. Der PBS-Überstand wurde abgegossen und verworfen und das Exosomenpellet anschließend erneut resuspendiert.

Für funktionelle Assays und die Experimente zur Überprüfung der Resistenzübertragung wurde das Pellet mit 100 µl PBS resuspendiert, um die Funktion und die Form der Exosomen zu erhalten.

Dahingegen wurde für die Exosomencharakterisierung mittels Immunoblot das Pellet mit 50 µl Lysatpuffer resuspendiert, um die Exosomen in die Proteinbestandteile aufzulösen.

#### 4.2.3. Exosomencharakterisierung

Die isolierten Exosomen sowie die zugehörigen Zellen wurden auf das Vorhandensein typischer exosomaler Marker untersucht. Zusätzlich wurde auf die Expression typischer zellulärer Marker getestet, um eine Aussage über eine mögliche Kontamination der Exosomenprobe treffen zu können. So konnte sichergestellt werden, dass durch die Ultrazentrifugation Exosomen eines hohen Reinheitsgrads isoliert wurden.

Um die Proteine der Exosomen sowie der Zellen ihrer Größe nach aufzutrennen, wurde eine SDS-Page entsprechend etablierter Protokolle durchgeführt. Der Transfer der

elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Membran erfolgte mittels Western Blot, sodass die Proteine anschließend durch Chemolumineszenz detektiert werden konnten.

#### 4.2.3.1 Vorbereitung der Proben

Um die exosomalen Proteine zu lysieren, wurde im letzten Schritt der Exosomenisolation das Exosomenpellet mit 50 µl Lysierungspuffer mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurde die Probe für 5 Minuten bei 20.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Das abzentrifugierte Pellet wurde verworfen.

Für die Herstellung des Zelllysats wurden die zugehörigen Zellen abgelöst und drei Mal mit PBS gewaschen. Die Zellpellets wurden dann, wie die Exosomenpellets, mit 50 µl Lysepuffer für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend ebenfalls für 5 Minuten bei 20.000 g und 4°C zentrifugiert.

Um die quantitative Proteinmenge der Lysatproben zu bestimmen, wurde ein Pierce™ BCA Protein Assay [Thermo Fisher Scientific] nach Herstellerangaben durchgeführt.

Mithilfe des BCA-Assays kann die Proteinkonzentration in einer Probe bestimmt werden. BCA steht als Abkürzung für Bicinchoninsäure (Englisch: Bicinchoninic Acid). Im BCA-Assay reagieren die Proteine der Probe mit zweiwertigen Kupferionen zu einwertigen Kupferionen. Die entstandenen einwertigen Kupferionen reagieren mit Bicinchoninsäure und bilden einen violetten Farbstoff, dessen Absorption anschließend photometrisch gemessen wird. Zunächst wird die Absorption mehrerer Proben mit einer bekannten, vorher definierten Proteinkonzentration gemessen. Anhand der Messergebnisse der bekannten Proteinkonzentrationen kann mithilfe der graphischen Darstellung der Absorptionsmessungen eine Geradengleichung erstellt werden. Durch Einsetzen des Messergebnisses der zu bestimmenden Probe kann dann letztendlich die Proteinkonzentration berechnet werden.

Entsprechend der Ergebnisse des BCA-Assays wurde dann das Exosomen- sowie das Zelllysats mit Lämmli-Puffer im Verhältnis 3:1 gemischt. Lämmli-Puffer setzt sich zusammen aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin, Beta-Mercaptoethanol, Bromphenolblau und 0,1% m/V SDS. SDS (Englisch: sodium dodecyl sulfact: Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Tensid, das die Proteine der Exosomenlysatsprobe aufbrechen kann und dafür sorgt, dass die Bindungen zwischen den einzelnen Aminosäuren gespalten werden. Die Proteine verlieren dadurch ihre Sekundär- und Tertiärstruktur und liegen dann in annähernd linearer Form vor, sodass eine Auftrennung nach ihrer Größe leichter vonstatten geht. Das SDS führt zusätzlich noch dazu, dass die Proteine negativ geladen werden und so in der Elektrophorese zum positiv geladenen Pol (Anode) wandern. Beta-Mercaptoethanol spaltet die in Proteinen vorhandenen

Disulfidbrücken und trägt so auch dazu bei, die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufzulösen. Glycin sorgt als Bestandteil des Puffers dafür, dass die Proteinproben eine höhere Dichte bekommen und sich so beim Beladen des Polyacrylamidgels nicht auflösen oder weggeschwemmt werden. Tris stabilisiert den pH-Wert der Proteinproben, sodass die Proben einerseits länger haltbar sind und andererseits vor enzymatischen Proteasereaktionen geschützt sind, die die Auftrennung der Proteine verfälschen könnten. Das Bromphenolblau dient als Färbung dazu, den Verlauf der Proteine im Polyacrylamidgel nachverfolgen zu können.

Die Lysatproben mit Lämmli-Puffer im Verhältnis 3:1 wurden dann für 5 Minuten bei 95°C im Thermoblock erhitzt, um die Proteine weiter zu denaturieren. Falls die Elektrophorese am selben Tag erfolgte, wurden die Proben nach Ablauf der 5 Minuten auf Eis gestellt. Ansonsten wurden sie bis zur weiteren Verwendung in Aliquots von jeweils 10 µg bei -80°C eingefroren.

#### 4.2.3.2 SDS-PAGE

SDS-PAGE steht als Abkürzung für „sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“ und dient der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe.

Für diese elektrophoretische Auftrennung der Proteine wurde ein Mini-PROTEAN TGX Gel 4 – 15 % von Biorad verwendet. Das Gel wurde nach Herstellerangaben vorbereitet und in die Elektrophoresekammer eingespannt. Die Kammer wurde dann mit Laufpuffer gefüllt, bis das Gel komplett bedeckt war.

Der vorgefärbte Protein-Marker PageRular™ von Thermo Scientific wurde jeweils in die erste Tasche des Gels pipettiert, um die Größe der aufgetrennten Proteine abschätzen zu können. Um einen gleichmäßigen elektrischen Widerstand zu gewährleisten, wurden immer alle Taschen des Gels beladen. Dann wurde die Elektrophorese gestartet und lief zunächst für 30 Minuten bei 70 V und 50 mA. Nach Ablauf der 30 Minuten wurde die Spannung für zwei weitere Stunden auf 120 V erhöht. Die SDS-Page wurde beendet, sobald der 15 kDa-Marker des PageRular™ den unteren Rand des Polyacrylamidgels erreicht hatte.

#### 4.2.3.3 Immunoblotting

Um die aufgetrennten Proteine im Polyacrylamidgel auf eine Membran zu übertragen und sichtbar zu machen, wurde anschließend an die SDS-Page ein Immunoblot (Semi-Dry-Methode) durchgeführt.

Während der Elektrophorese wurde die Membran für das sich anschließende Blotting aktiviert. Die verwendete PVDF-Membran wurde zuerst für 1 Minute in Methanol geschwenkt, danach mit Aqua dest. gewaschen und dann bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur in Transferpuffer auf dem Shaker inkubiert.

Auf die Anode des Blotters wurden zwei Lagen Whatman-Papier gelegt und mit Transferpuffer getränkt. Die aktivierte PVDF-Membran wurde aus dem Transferpuffer herausgenommen und auf das nasse Whatman-Papier platziert. Sobald die Elektrophorese abgeschlossen war, wurde das Polyacrylamidgel nach Herstellerangaben aus dem Plastikrahmen herausgelöst und passgenau auf die aktivierte PVDF-Membran gelegt. Das Gel wurde dann mit 2 weiteren Lagen nassem Whatman-Papier abgedeckt, um die PVDF-Membran für die gesamte Dauer des Blottens feucht zu halten. Überschüssiger Transferpuffer wurde von der Anode abgewischt, sodass der angelegte Strom ausschließlich durch das Papier, das Gel und die Membran wandert. Nach Anlage der Kathode wurden dann die Elektroden angeschlossen. Das Blotting erfolgte bei einem konstanten Strom von 120 mA, einer maximalen Spannung von 30 V und einer maximalen Leistung von 50 W für eine Stunde.

#### 4.2.3.4 Antikörperdetektion

Nach Ablauf des Proteintransfers auf die PVDF-Membran wurde die Membran zweimalig für 20 Minuten mit TBsT gewaschen, um Überreste des Transferpuffers zu entfernen. Das Polyacrylamidgel und das Whatmann-Papier wurden verworfen.

Anschließend an die Waschschrte wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5% BSA oder 5% Milch auf dem Shaker inkubiert, um unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden.

Sobald die Membran blockiert war, konnten die zu untersuchenden Primäantikörper auf die Membran gegeben werden (Tab. 15). Entsprechend des Molekulargewichts der Antikörper wurde die PVDF-Membran in mehrere Teile geschnitten, um 3 bis maximal 4 Antikörper gleichzeitig untersuchen zu können. Nach Zugabe des Primäantikörpers auf die Membran erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C.

**Tabelle 15:** Verwendete Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Molekulargewicht</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Verdünnung in</b>
CD81 (Mouse)	25 kDa	1:1000	5% BSA
CD63 (Mouse)	28 – 35 kDa	1:1000	5% Milch
Syntenin (Rabbit)	32 kDa	1:1000	5% BSA
Axl (Rabbit)	138 kDa	1:1000	5% BSA
Met (Mouse)	145 kDa	1:1000	
GAPDH (Rabbit)	37 kDa	1:1000	5% Milch
GM130 (Rabbit)	130 kDa	1:1000	
anti-Mouse-IgG HRP-linked Antibody		1:2000	entsprechend des Primärantikörpers
anti-Rabbit-IgG HRP-linked Antibody		1:2000	entsprechend des Primärantikörpers

Am nächsten Tag wurden die Primärantikörper mit einer 5 ml Eppendorf Pipette abgenommen und zur erneuten Verwendung bei -20°C eingefroren. Die PVDF-Membran wurde drei Mal für jeweils 10 Minuten mit TBsT gewaschen, um Rückstände des Primärantikörpers zu entfernen. Entsprechend der verwendeten Primärantikörper wurden in dieser Zeit die Sekundärantikörper im Verhältnis 1:2000 angesetzt. Dazu wurden jeweils 3000 µl 5% BSA oder 5% Milch mit 1,5 µl anti-Mouse- oder anti-Rabbit-Antikörpern versetzt. Alle verwendeten Antikörper wurden dauerhaft auf Eis aufbewahrt, um die Stabilität der Antikörper sicherstellen zu können. Nach dem letzten Waschschrift mit TBsT wurden dann die vorbereiteten Sekundärantikörper auf die PVDF-Membran gegeben und für 90 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Shaker inkubiert. Nach 90 Minuten wurde der Sekundärantikörper abgenommen und verworfen und die Membran erneut 3-mal für jeweils 10 Minuten mit TBsT gewaschen, um mögliche Rückstände des Sekundärantikörpers zu entfernen.

Die Detektion der Antikörper erfolgte unter Verwendung der Pierce ECL Western Blotting Substrate mittels Chemolumineszenz. ECL steht als Abkürzung für Enhanced Chemoluminescence. Bei der Reaktion von ECL entstehen so genannte Acridinium-Ester, die mit Peroxiden reagieren. Diese Reaktion wird durch das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP, Englisch: Horseradish Peroxidase) katalysiert und produziert ein starkes chemoluminescentes Signal, was mithilfe einer speziellen Bildgebung detektiert werden kann.

Die Bilder wurden mithilfe des Intas Imager aufgenommen und ausgewertet.

#### 4.2.4. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Mithilfe der NTA-Messung wurde die Größe der isolierten Vesikel bestimmt. So konnte sichergestellt werden, dass die isolierten Vesikel den in der Literatur gängigen Größenangaben von 30 – 150 nm entsprechen. Das Prinzip der Nanoparticle Tracking Analysis beruht auf der Brownschen Molekularbewegung der Exosomen. Diese Eigenbewegung der Teilchen wird für jedes einzelne Teilchen mithilfe eines Computerprogramms visualisiert und verfolgt. Aus den gewonnenen Daten wird dann durch das Computerprogramm die Größe jedes einzelnen Partikels und eine Größenverteilung berechnet. Die Messungen für die NTA wurden sowohl von Exosomen aus 786-O<sup>WT</sup> als auch von Exosomen aus 786-O<sup>PR</sup> angefertigt. Dazu wurden die Exosomen isoliert und dann mit 100 µl PBS resuspendiert. Die entsprechende Probe wurde dann jeweils 1:100 und 1:500 in PBS verdünnt und anschließend gemessen.

#### 4.2.5. Überprüfung der Resistenzübertragung

Um zu überprüfen, ob Exosomen eine Resistenz gegen Tyrosinkinaseinhibitoren induzieren können, wurde mit den isolierten Exosomen ein funktionelles Assay durchgeführt. An Tag 1 wurden jeweils  $1,4 \cdot 10^4$  786-O<sup>WT</sup> -Zellen in 6 Wells einer 12-Well-Platte ausgesät (Abb. 15). Um Kontamination durch fetale Exosomen aus dem Kälberserum zu vermeiden, wurde auch hierzu DMEM/RPMI +10% ED-FCS verwendet. Bei der Exosomenisolation wurde darauf geachtet, stets steril zu arbeiten um auch die Gefahr einer bakteriellen Kontamination der Zellen nach Exosomenbehandlung möglichst gering zu halten. Zur weiteren Kontaminationsprophylaxe wurde das Zellkulturmedium mit 1% Penicillin/Streptomycin versetzt.

**Abbildung 15:** Belegung der 12-Well-Platte

	786-O WT $1,4 \cdot 10^4$ Zellen	786-O WT $1,4 \cdot 10^4$ Zellen	
	786-O WT $1,4 \cdot 10^4$ Zellen	786-O WT $1,4 \cdot 10^4$ Zellen	
	786-O WT $1,4 \cdot 10^4$ Zellen	786-O WT $1,4 \cdot 10^4$ Zellen	

An Tag 2 und Tag 3 erfolgte jeweils die Stimulation der 786-O<sup>WT</sup>-Zellen mit den isolierten Exosomen (Abb. 16). Dabei wurden jeweils 2 Wells mit Exosomen, die von 786-O<sup>WT</sup> stammen, behandelt, 2 weitere Wells wurden mit Exosomen, die von 786-O<sup>PR</sup> stammen, behandelt. Um auch dosisabhängige Effekte zu untersuchen, wurden die Zellen jeweils mit 8 µg/ml und mit 20 µg/ml stimuliert. Zur Kontrolle wurden zwei Wells jeweils PBS in der gleichen maximalen Konzentration verabreicht. An Tag 3 erfolgte zusätzlich eine Auffrischung des Zellkulturmediums, indem zunächst jeweils 300 µl des verbrauchten Mediums abgenommen und verworfen wurden. Anschließend wurde das abgenommene Volumen mit frischem Zellkulturmedium ersetzt.

**Abbildung 16:** Stimulation der 12-Well-Platte mit Exosomen

	786-O WT CTR PBS	786-O WT CTR PBS	
	786-O WT WT Exo 8 µg/ml	786-O WT WT Exo 20 µg/ml	
	786-O WT Paz Exo 8 µg/ml	786-O WT Paz Exo 20 µg/ml	

An Tag 4 hatten die Zellen durchschnittlich eine Konfluenz von 85-90% erreicht. Die Zellen wurden aus der 12-Well-Platte gelöst und die Zellzahl mithilfe des Luna Automated Cell Counters bestimmt. Anschließend wurden jeweils  $1 \cdot 10^3$  Zellen in eine 96-Well-Platte ausgesät (Abb. 17). Als weitere Referenz wurden 786-O<sup>PR</sup>-Zellen, die vorher nicht mit Exosomen stimuliert worden waren, ebenfalls in die 96-Well-Platte ausgesät. Circa eine halbe Stunde nach Aussäen der Zellen wurden die vorher behandelten Zellen erneut mit Exosomen in der gleichen Konzentration wie zuvor stimuliert und dann für 24 Stunden inkubiert.

**Abbildung 17:** Belegung der 96-Well-Platte (Funktionelle Assays)

	DMSO			Pazopanib 14 $\mu$ M								
786-O WT CTR PBS												
786-O WT WT Exo 8 $\mu$ g/ml												
786-O WT WT Exo 20 $\mu$ g/ml												
786-O WT Paz Exo 8 $\mu$ g/ml												
786-O WT Paz Exo 20 $\mu$ g/ml												
786-O Paz ohne Exosomen												

An Tag 5 erfolgte nach 24 Stunden Inkubationszeit die Medikamentengabe. Hierzu wurden jeweils 3 Wells pro Zelllinie mit Pazopanib in einer Konzentration von 14  $\mu$ M behandelt. Als Kontrolle wurden ebenfalls 3 Wells pro Zelllinie mit DMSO in der gleichen Konzentration behandelt. Anschließend wurden die Zellen für weitere 72 Stunden inkubiert.

An Tag 8 wurde dann ein WST-1-Assay durchgeführt. Die Zellviabilität wurde anhand der oben bereits genannten Standardisierungen bestimmt.

#### 4.2.6. Aufnahme fluoreszenzmarkierter Exosomen

Zur Überprüfung der Aufnahme von Exosomen in die Zellen wurden isolierte Exosomen mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert und auf 786-O<sup>WT</sup>-Zellen gegeben. Danach erfolgte die Detektion der Färbung mittels Laserscanner.

##### 4.2.6.1 Aussäen der Zellen

An Tag 1 wurden Zellen der Zelllinie 786-O<sup>WT</sup> in einen 4-Kammer-Objektträger mit einer Wachstumsfläche von 1,7 cm<sup>2</sup> pro Well ausgesät (Abb. 18). Pro Kammer wurden jeweils  $7 \cdot 10^3$  Zellen in 1 ml DMEM/RPMI + 1% PenStrep gegeben, um Verunreinigungen durch Bakterien vorzubeugen. Da die Aufnahme der Exosomen untersucht werden sollte, wurde auch für diesen Versuch 10% exosomen-depletiertes FCS im Zellkulturmedium verwendet.

**Abbildung 18:** Belegung der Kammerobjektträger

Objektträger 1 Kontrolle PBS		786-O WT 7·10 <sup>3</sup> Zellen	786-O WT 7·10 <sup>3</sup> Zellen	
Objektträger 2 Exosomen 786-O WT		786-O WT 7·10 <sup>3</sup> Zellen	786-O WT 7·10 <sup>3</sup> Zellen	
Objektträger 3 Exosomen 786-O Paz		786-O WT 7·10 <sup>3</sup> Zellen	786-O WT 7·10 <sup>3</sup> Zellen	

#### 4.2.6.2 PKH26-Markierung von Exosomen

An Tag 2 erfolgte die Markierung der Exosomen mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff PKH26. Dieser lipophile Farbstoff färbt Membranen rot, indem er den aliphatischen Teil seiner Struktur in die Bestandteile der Doppellipidschicht der Zellmembran einlagert und so die Membran sichtbar macht.

Die genannten Arbeitsschritte erfolgten alle im Dunkeln und unter Verwendung von Alufolie, um eine Verfälschung der Färbung durch Licht zu verhindern.

Zunächst wurden die isolierten Exosomen auf Eis aufgetaut. In jeweils drei Reaktionsgefäße (Gefäß 1) wurde je 500 µl Diluent C pipettiert. Die in PBS resuspendierten Exosomen wurden hinzugegeben und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Zur Kontrolle wurde im dritten Reaktionsgefäß 100 µl PBS in Diluent C gelöst und auf Eis inkubiert. In drei weiteren Reaktionsgefäßen (Gefäß 2) wurden jeweils 2 µl PKH26 in 500 µl Diluent C gelöst und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Inhalt der Gefäße 1 in die Gefäße 2 überführt und gut durchmischt. Während der Inkubationszeit von 5 Minuten wurde der Ansatz immer wieder gut resuspendiert, um eine gleichmäßige Anlagerung des Farbstoffs an die Exosomenmembran gewährleisten zu können. Zum Abstoppen der Färbereaktion wurde pro Reaktionsgefäß 1 ml ED-FCS hinzugegeben und eine weitere Minute abgewartet. Um überschüssigen Farbstoff aus dem Ansatz zu entfernen, wurde die Lösung in ein Pierce™ Protein Concentrator Reaktionsgefäß überführt und für 30 Minuten bei 3000 g und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Eluat in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die gefärbte Lösung auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert (Tab. 16).

**Tabelle 16:** Stimulation mit Exosomen

<b>Objektträger</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Lösung pro Well</b>	60 µl	60 µl	50 µl

#### 4.2.6.3 Fixierung der Zellen und Phalloidin-Färbung

An Tag 3 wurden zur Lokalisation der Exosomen die Zellen selbst gefärbt (Tab. 17). Hierzu wurde der grüne Fluoreszenzfarbstoff Phalloidin-iFluor 488 verwendet, der selektiv an das F-Aktin des Zytoskeletts der Zellen bindet und so die Zellen selbst im Fluoreszenzmikroskop sichtbar macht.

**Tabelle 17:** Fixierung der Zellen und Phalloidin-Färbung

<b>Arbeitsschritt</b>		<b>Menge</b>	<b>Dauer</b>
<b>1.</b>	<i>Entfernung des Zellkulturmediums</i>		
<b>2.</b>	<i>Waschschrift</i>		
	Kaltes PBS (+Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )	3-mal	kurz
<b>3.</b>	<i>Fixierung der Zellen</i>		
	Kaltes PFA 4% in PBS	500 µl/Kammer	30 Minuten
<b>4.</b>	<i>Waschschrift</i>		
	Kaltes PBS (+Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )	3-mal	kurz
<b>5.</b>	<i>Permeabilisation</i>		
	PBS 0,1% Triton X (PBST)	600 µl/Kammer	10 Minuten
<b>6.</b>	<i>Waschschrift</i>		
	Kaltes PBS (+Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )	3-mal	kurz
<b>7.</b>	<i>Blockieren</i>		
	3% BSA in PBST	600 µl/Kammer	45 Minuten
<b>8.</b>	<i>Immunfärbung</i>		
	Phalloidin-iFluor 488 Konjugat	150 µl/Kammer	60 Minuten
<b>9.</b>	<i>Waschschrift</i>		
	Kaltes PBS (+Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )	3-mal	5 Minuten
<b>10.</b>	<i>Gegenfärbung und Mounting</i>		
	VECTASHIELD Medium mit DAPI		
<b>11.</b>	<i>Konservieren der Probe</i>		

Nachdem das Zellkulturmedium entfernt wurde, erfolgte der erste Waschschrift mit kaltem PBS. Das verwendete PBS enthielt Calcium und Magnesium, um die interzellulären Bindungen und die Zelladhärenz an die Wachstumsfläche zu verstärken. So konnte ein Ablösen der Zellen während der Färbeschritte und der Fixierung verhindert werden. Nach dem ersten Waschschrift wurden die Zellen für 20 Minuten mit Paraformaldehyd 4% in PBS fixiert und anschließend erneut mit kaltem PBS gewaschen. Danach erfolgte die Permeabilisation der Zellmembran mit PBS und 0,1% Triton X für 10 Minuten, sodass der Farbstoff besser in die Zellen eindringen und das Zytoskelett der Zellen leichter gefärbt werden konnte. Nachfolgend wurden die Zellen erneut mit kaltem PBS gewaschen, um Überstände des Triton X zu entfernen. Anschließend erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungen durch Inkubation der Zellen mit 3% BSA in PBST für 45 Minuten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Lösung abgenommen und verworfen. Der Fluoreszenzfarbstoff Phalloidin-iFluor wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in Antikörper-Diluent gelöst und für eine Dauer von 60 Minuten auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen erneut mit kaltem PBS gewaschen und die Kammern und Überstände des Klebers vom Objektträger entfernt. Um ein Ausbleichen der Färbung zu verhindern, wurden die Zellen mit Antifade Shield Medium mit DAPI gegengefärbt. DAPI ist ein Farbstoff, der die DNA der Zellen färbt und so die Zellkerne sichtbar macht. Dann wurden die Zellen mit einem Deckgläschen abgedeckt und bis zur Detektion bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

#### 4.2.6.4 Detektion

Die Proben wurden mithilfe des Laser scanning Mikroskops LSM 780 (Carl Zeiss AG) mikroskopiert und anschließend auch fotografiert (Tab. 18). Die aufgenommenen Fotos wurden dann mit der Software Zen 12 Lite der Carl Zeiss AG bearbeitet und exportiert.

**Tabelle 18:** Einstellungen und Farblegende

<b>Kanal</b>	1	2	4
<b>Kanalfarbe</b>	blau	grün	rot
<b>Anregungswellenlänge [nm]</b>	405	491	551
<b>Emissionswellenlänge [nm]</b>	447	516	567
<b>Farbe</b>	<b>gefärbte Struktur</b>		
Grün (Alexa-Fluor 488)	F-Aktin		
Rot (PKH26)	Exosomen		
Blau (Dapi)	Zellkerne		
Gelb	Overlay von rotem und grünem Kanal		

## 5. Ergebnisse

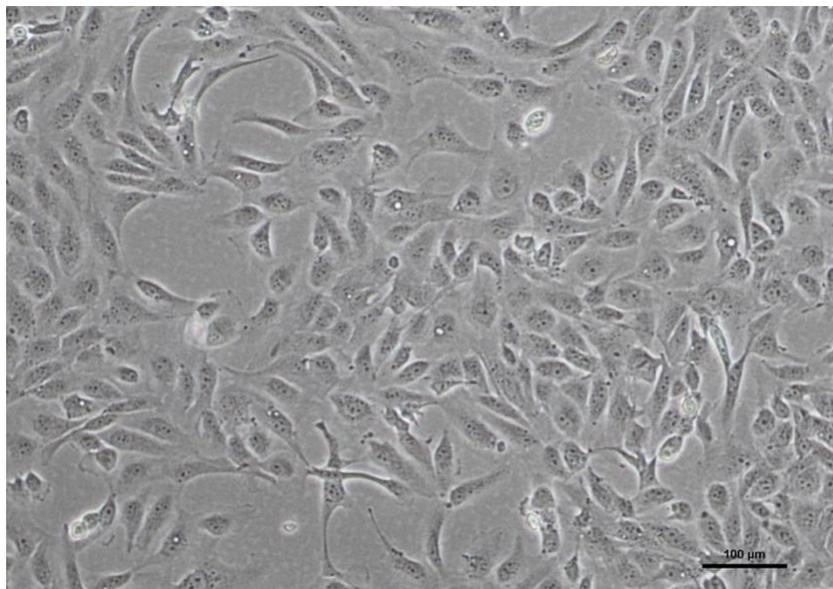
### 5.1 Etablierung der Zellzahlen

Zunächst wurden die Zellzahlen für die verschiedenen Experimente in Abhängigkeit von den verwendeten Kulturgefäßen und Volumina etabliert (Tab. 19). Bei den Exosomenisolationen betrug die Konfluenz am Tag der Abnahme des Exosomen-depletierten Mediums 90 bis 95 Prozent (Abb. 19 und 20).

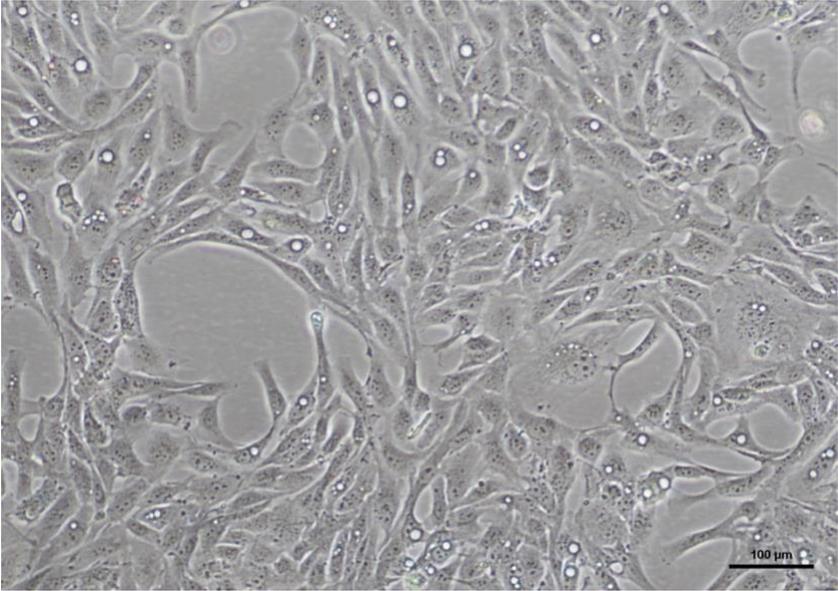
**Tabelle 19:** Verwendete Zellzahlen für sämtliche Methoden/Experimente

<b>Methode/Experiment</b>	<b>Verwendete Gesamtzellzahl</b>	
	786-O <sup>WT</sup>	786-O <sup>PR</sup>
Subkultivieren der Zellen		
Wachstumsfläche 25 cm <sup>2</sup>	4 Tage: $4 \cdot 10^4$ 3 Tage: $1 \cdot 10^5$	4 Tage: $8 \cdot 10^4$ 3 Tage: $1,5 \cdot 10^5$
Wachstumsfläche 75 cm <sup>2</sup>	4 Tage: $1,2 \cdot 10^5$ 3 Tage: $2 \cdot 10^5$	4 Tage: $2 \cdot 10^5$ 3 Tage: $3 \cdot 10^5$
Wachstumsfläche 500 cm <sup>2</sup>	6 Tage: $3 \cdot 10^5$	7 Tage: $3 \cdot 10^5$
WST-1-Assays	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^3$
Funktionelle Assays 12-Well-Platte	$1,4 \cdot 10^4$	
Uptake-Assay 4-Kammer-Objektträger	$7 \cdot 10^3$	

**Abbildung 19:** Konfluenz von 786-O<sup>WT</sup> am Tag der Abnahme des Exosomen-depletierten Mediums (beispielhaft)



**Abbildung 20:** Konfluenz von 786-O<sup>PR</sup> am Tag der Abnahme des Exosomen-depletierten Mediums (beispielhaft)



## 5.2 Überprüfung der Resistenz gegen Pazopanib in der Zelllinie 786-O nach Langzeitbehandlung

Die Zelllinie 786-O wurde in unserer Arbeitsgruppe von Dr.rer.nat. Bozhena Vynnytska-Myronovska über einen Zeitraum von 3 Monaten mit Pazopanib [14  $\mu$ M] behandelt, um eine Resistenz gegen den Tyrosinkinaseinhibitor zu induzieren.

Im ersten Teil der Arbeit sollte zunächst die erzeugte Resistenz der Zelllinie 786-O<sup>PR</sup> gegen Pazopanib nachgewiesen werden. Dazu wurden 786-O<sup>WT</sup>- und 786-O<sup>PR</sup>-Zellen für eine Dauer von 72 Stunden mit verschiedenen Pazopanib-Konzentrationen behandelt. Das Zellkulturmedium für die Zellen der Kontrollgruppe (CTR) enthielt DMSO der jeweils gleichen Konzentration. Nach 72 Stunden erfolgte die Messung der Absorptionen mittels WST-1-Assay.

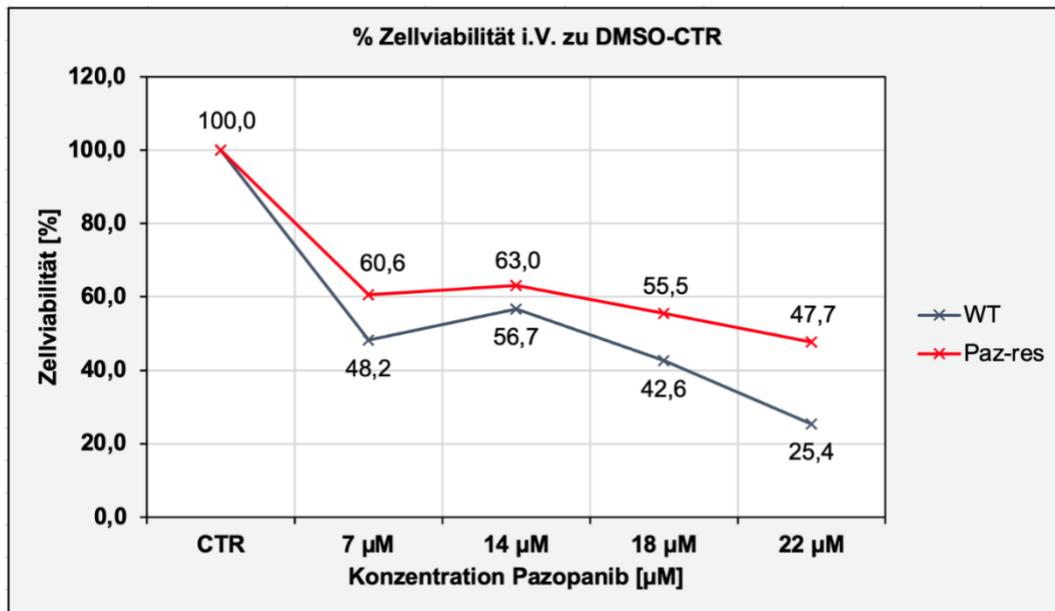
### 5.2.1 Zellviabilitätswerte von 786-O<sup>PR</sup> im Vergleich zu 786-O<sup>WT</sup> bei steigenden Pazopanib-Konzentrationen

Um das Verhalten der Zelllinien 786-O<sup>WT</sup> und 786-O<sup>PR</sup> bei steigenden Pazopanib-Konzentrationen zu beurteilen, wurden insgesamt 3 unabhängige Experimente durchgeführt.

1. Experiment: Mit zunehmender Pazopanib-Konzentration sinkt die Zellviabilität bei beiden Zelllinien (Abb. 21). 786-O<sup>PR</sup> zeigt bei einer Konzentration von 22  $\mu$ M mit 47,7% den niedrigsten Zellviabilitätswert. Bei 786-O<sup>WT</sup> ist die niedrigste Zellviabilität ebenfalls bei 22  $\mu$ M zu finden (25,4%).

786-O<sup>PR</sup> weist bei allen Konzentrationen eine höhere Zellviabilität als 786-O<sup>WT</sup> auf. Der prozentuale Unterschied der Zellviabilität zwischen den beiden Zelllinien beträgt minimal 6,3% bei 14  $\mu$ M und maximal 22,3% bei 22  $\mu$ M.

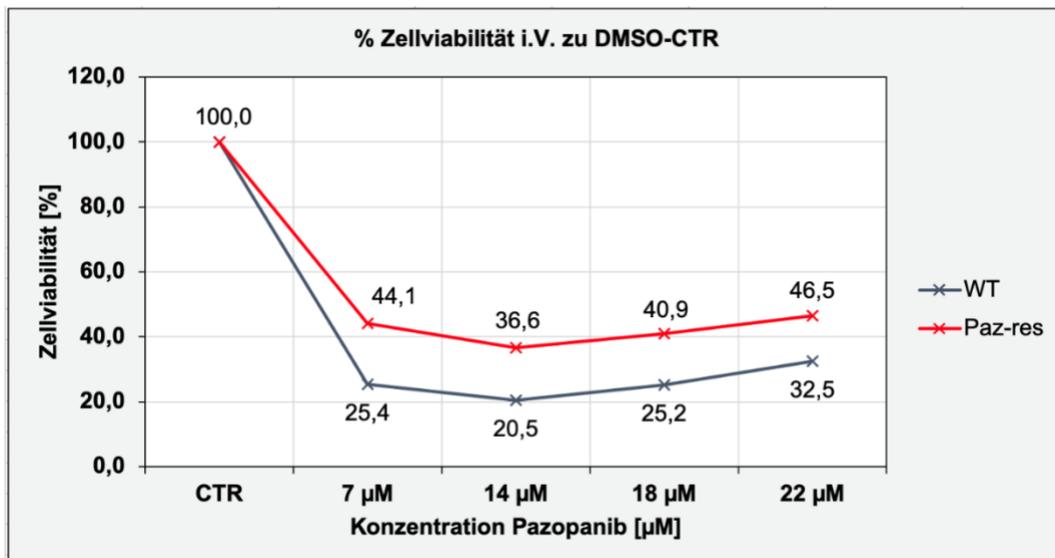
**Abbildung 21:** % Zellviabilität der Zelllinien 786-O<sup>WT</sup> (blau) und 786-O<sup>PR</sup> (rot) in Prozent (y-Achse) nach 72-stündiger Behandlung mit Pazopanib unter verschiedenen Konzentrationen (x-Achse) (Experiment 1) Mittelwerte aus 2 unabhängigen biologischen Replikaten, je 3 techn. Replikate pro Zelllinie Kontrolle (CTR) enthielt DMSO [7%]



2. Experiment: Die Zellviabilität von 786-O<sup>PR</sup> liegt stets über der Zellviabilität von 786-O<sup>WT</sup>, wobei die beobachteten prozentualen Unterschiede minimal 14% bei 22 μM und maximal 18,7% bei 7 μM betragen (Abb. 22). 786-O<sup>PR</sup> zeigt bei einer Konzentration von 14 μM mit 36,6% den niedrigsten Zellviabilitätswert. Bei 786-O<sup>WT</sup> ist die niedrigste Zellviabilität ebenfalls bei 14 μM zu finden (20,5%).

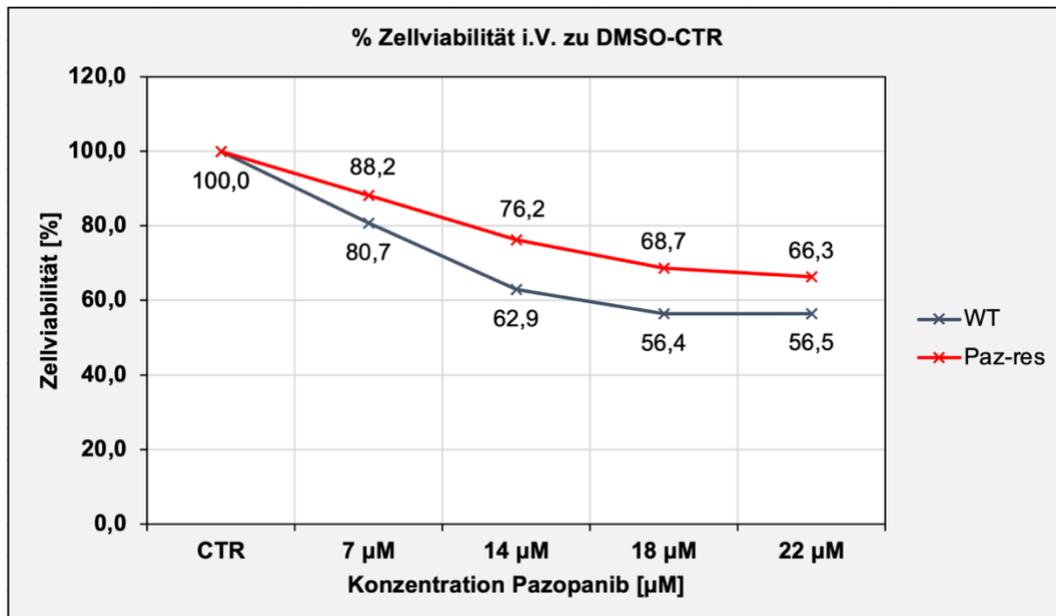
Im Gegensatz zum Vorexperiment zeigte sich ein Anstieg der Zellviabilität unter höheren Pazopanib-Konzentrationen.

**Abbildung 22:** % Zellviabilität der Zelllinien 786-O<sup>WT</sup> (blau) und 786-O<sup>PR</sup> (rot) in Prozent (y-Achse) nach 72-stündiger Behandlung mit Pazopanib unter verschiedenen Konzentrationen (x-Achse) (Experiment 2) Mittelwerte aus 2 unabhängigen biologischen Replikaten, je 3 techn. Replikate pro Zelllinie Kontrolle (CTR) enthielt DMSO [7%]



3. Experiment: Mit zunehmender Pazopanib-Konzentration sinkt die Zellviabilität beider Zelllinien kontinuierlich (Abb. 23). 786-O<sup>PR</sup> zeigt bei einer Konzentration von 22 μM mit 66,3% den niedrigsten Zellviabilitätswert. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Vorexperimente zeigt 786-O<sup>PR</sup> auch im dritten Experiment stets eine höhere Zellviabilität als 786-O<sup>WT</sup>. Der minimale prozentuale Unterschied beträgt hier 7,5% bei 7 μM, der maximale prozentuale Unterschied beträgt 13,3% bei 14 μM.

**Abbildung 23:** % Zellviabilität der Zelllinien 786-O<sup>WT</sup> (blau) und 786-O<sup>PR</sup> (rot) in Prozent (y-Achse) nach 72-stündiger Behandlung mit Pazopanib unter verschiedenen Konzentrationen (x-Achse) (Experiment 3) Mittelwerte aus 2 unabhängigen biologischen Replikaten, je 3 techn. Replikate pro Zelllinie Kontrolle (CTR) enthielt DMSO [7%].



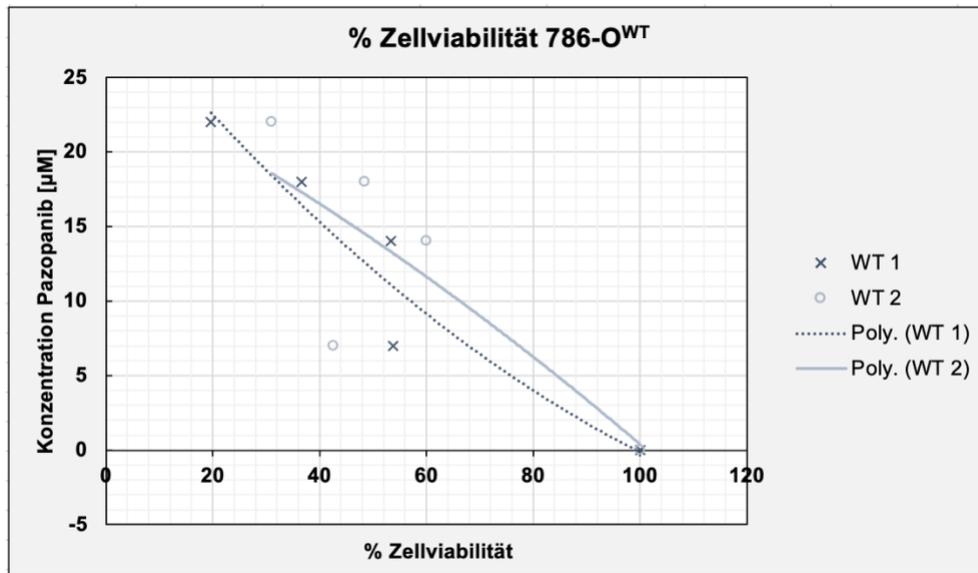
In Zusammenschau der Ergebnisse aus drei Experimenten wird unter steigenden Pazopanib-Konzentrationen ein klarer Trend zu einem erhöhten Überleben von 786-O<sup>PR</sup> im Vergleich zu 786-O<sup>WT</sup> deutlich.

#### 5.2.2 IC<sub>50</sub> von 786-O<sup>PR</sup> im Vergleich zu 786-O<sup>WT</sup>

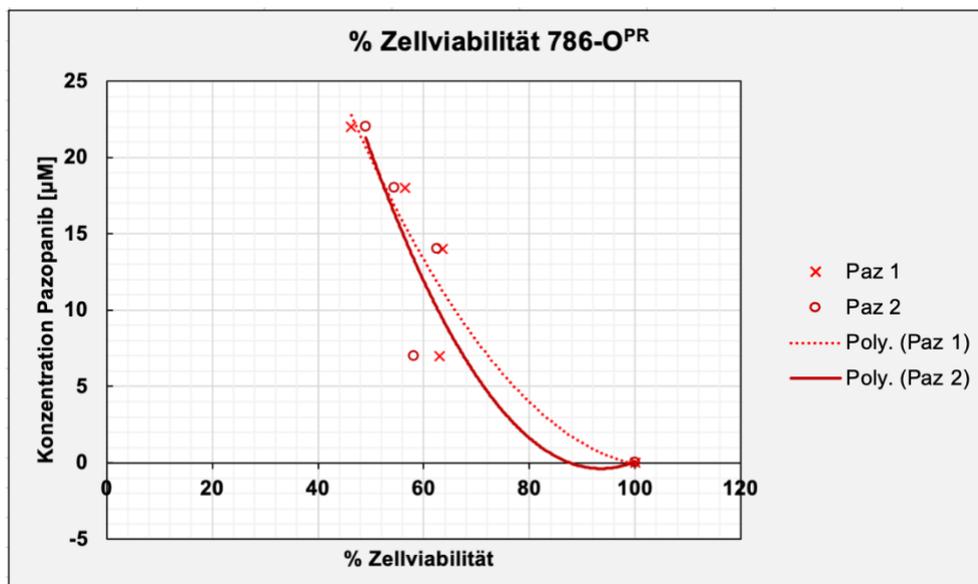
Zur Berechnung der IC<sub>50</sub> (= Konzentration, die das Zellwachstum um 50% hemmt) wurden in einem Diagramm die Zellviabilitätswerte (x-Achse) und die verwendeten Pazopanib-Konzentrationen (y-Achse) aufgetragen. Durch das Einfügen einer polynomischen Trendlinie ergab sich eine Annäherungsgleichung für den jeweiligen Graphen (Abb. 24 und 25). Mithilfe der Annäherungsgleichungen konnte dann die IC<sub>50</sub> berechnet werden (Tab. 20).

Für das Experiment 2 konnte aufgrund der ansteigenden Zellviabilitätswerte bei höheren Pazopanib-Konzentrationen (vgl. Abb. 22) keine Trendlinie generiert werden, die die gemessenen Werte annähernd korrekt repräsentieren könnte. Eine mathematische Berechnung der IC<sub>50</sub> war daher nicht möglich.

**Abbildung 24:** Konzentration Pazopanib [ $\mu\text{M}$ ] (y-Achse) mit korrespondierender Zellviabilität [%] (x-Achse) von 786-O<sup>WT</sup> (2 biologische Replikat, WT 1 und 2) und zugehörige polynomische Trendlinie (Poly. (WT 1 und 2))  
Polynomische Trendlinien generiert durch Microsoft® Excel®, Mittelwerte aus je 3 techn. Replikaten pro Zelllinie



**Abbildung 25:** Konzentration Pazopanib [ $\mu\text{M}$ ] (y-Achse) mit korrespondierender Zellviabilität [%] (x-Achse) von 786-O<sup>PR</sup> (2 biologische Replikat, Paz 1 und 2) und zugehörige polynomische Trendlinie (Poly. (Paz 1 und 2))  
Polynomische Trendlinien generiert durch Microsoft® Excel®, Mittelwerte aus je 3 techn. Replikaten pro Zelllinie

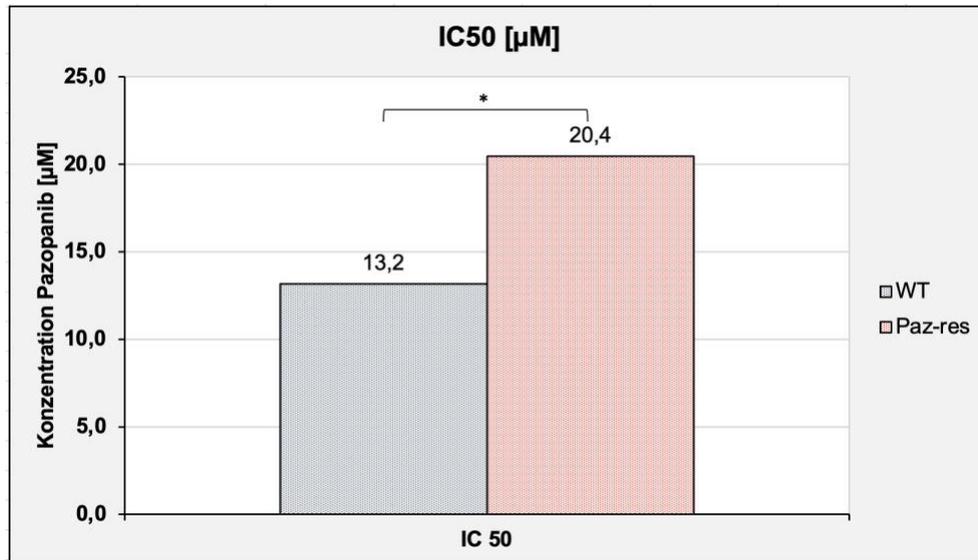


**Tabelle 20:** Annäherungsgleichung und Bestimmtheitsmaß für polynomische Trendlinien (Experiment 1)

Experiment 1	Annäherungsgleichung	Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ )
786-O <sup>WT</sup> (Biol. Replikat 1)	$y = 0,0013x^2 - 0,4353x + 30,701$	0,9126
786-O <sup>WT</sup> (Biol. Replikat 2)	$y = -0,0006x^2 - 0,1845x + 24,869$	0,6453
786-O <sup>PR</sup> (Biol. Replikat 1)	$y = 0,0066x^2 - 1,3869x + 72,846$	0,8865
786-O <sup>PR</sup> (Biol. Replikat 2)	$y = 0,011x^2 - 2,0482x + 95,38$	0,8136

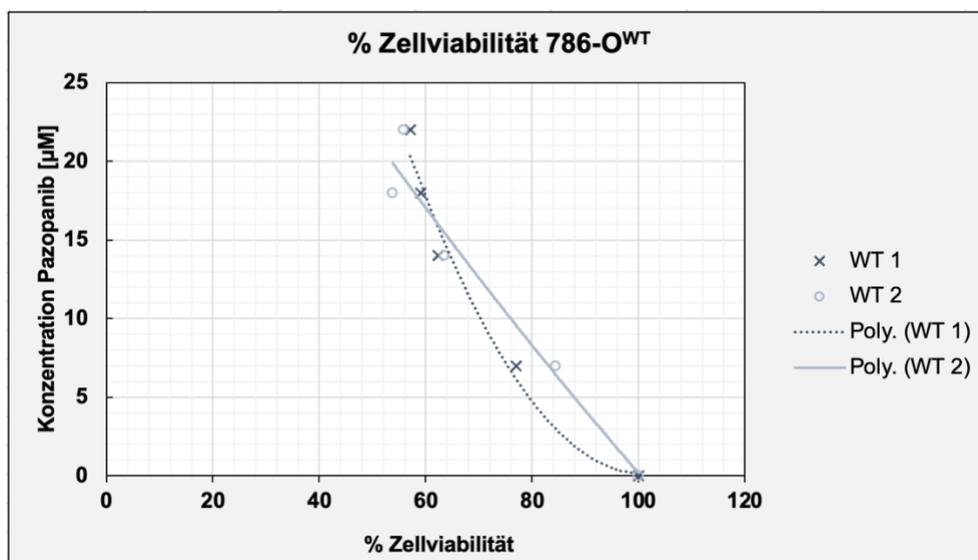
Die IC<sub>50</sub> von 786-O<sup>PR</sup> liegt mit 20,4 µM signifikant über der IC<sub>50</sub> von 786-O<sup>WT</sup> mit 13,2 µM (p = 0,02) (Abb. 26).

**Abbildung 26:** Berechnete IC<sub>50</sub> [µM] (y-Achse) der Zelllinien 786-O<sup>WT</sup> (blau) und 786-O<sup>PR</sup> (rot) (x-Achse) (Experiment 1)  
Mittelwerte aus 2 unabhängigen biologischen Replikaten, jeweils 3 technische Replikate pro Zelllinie

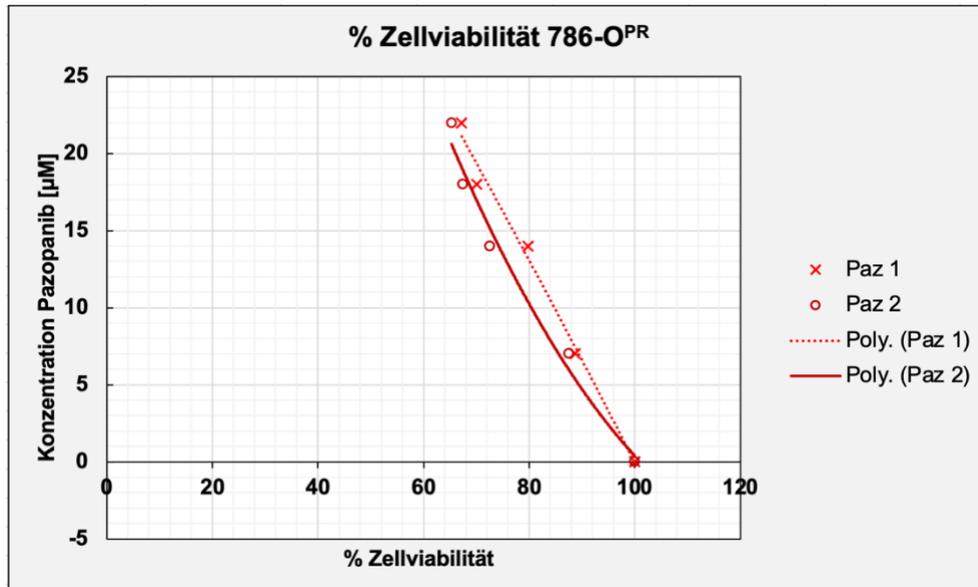


Für die Auswertung des 3. Experiments ergab sich, analog zum 1. Experiment, mithilfe einer polynomischen Trendlinie für 786-O<sup>WT</sup> (Abb. 27) und 786-O<sup>PR</sup> (Abb. 28) jeweils eine Annäherungsgleichung (Tab. 21)

**Abbildung 27:** Konzentration Pazopanib [µM] (y-Achse) mit korrespondierender Zellviabilität [%] (x-Achse) von 786-O<sup>WT</sup> (2 biologische Replikate, WT 1 und 2) und zugehörige polynomische Trendlinie (Poly. (WT 1 und 2))  
Polynomische Trendlinien generiert durch Microsoft® Excel®, Mittelwerte aus je 3 techn. Replikaten pro Zelllinie



**Abbildung 28:** Konzentration Pazopanib [ $\mu\text{M}$ ] (y-Achse) mit korrespondierender Zellviabilität [%] (x-Achse) von 786-O<sup>PR</sup> (2 biologische Replikate, Paz 1 und 2) und zugehörige polynomische Trendlinie (Poly. (Paz 1 und 2))  
Polynomische Trendlinien generiert durch Microsoft® Excel®, Mittelwerte aus je 3 techn. Replikaten pro Zelllinie

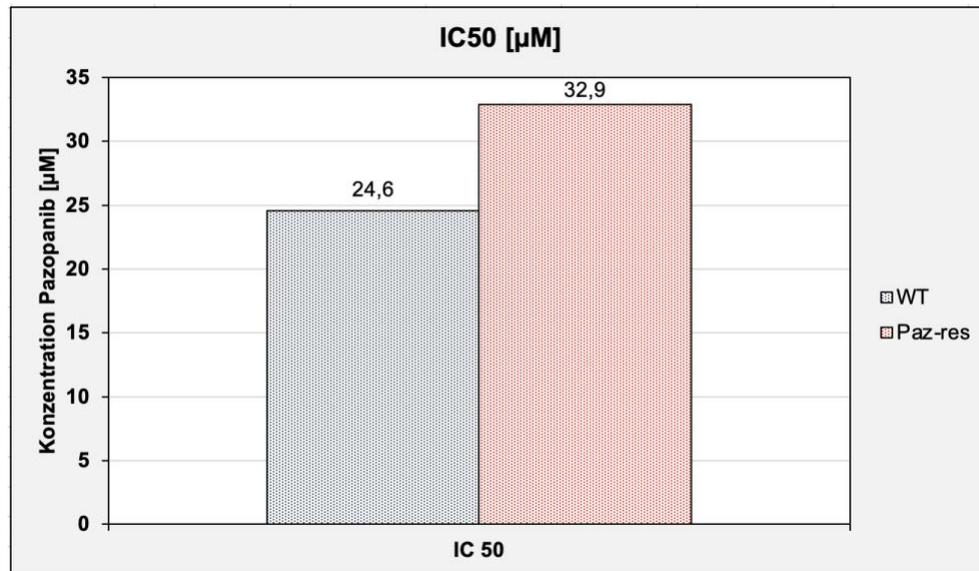


**Tabelle 21:** Annäherungsgleichung und Bestimmtheitsmaß für polynomische Trendlinien  
(Experiment 3)

<b>Experiment 2</b>	<b>Annäherungsgleichung</b>	<b>Bestimmtheitsmaß (<math>R^2</math>)</b>
786-O <sup>WT</sup> (Biol. Replikat 1)	$y = 0,0106x^2 - 2,1354x + 107,77$	0,9771
786-O <sup>WT</sup> (Biol. Replikat 2)	$y = 0,0008x^2 - 0,5478x + 47,09$	0,9502
786-O <sup>PR</sup> (Biol. Replikat 1)	$y = -0,0008x^2 - 0,51x + 59,07$	0,9886
786-O <sup>PR</sup> (Biol. Replikat 2)	$y = 0,0061x^2 - 1,5884x + 98,384$	0,9826

Die IC<sub>50</sub> von 786-O<sup>PR</sup> liegt mit 32,9  $\mu\text{M}$  über der IC<sub>50</sub> von 786-O<sup>WT</sup> mit 24,6  $\mu\text{M}$  (Abb. 29). Jedoch wurde keine statistische Signifikanz erreicht ( $p = 0,12$ ).

**Abbildung 29:** Berechnete IC50 [ $\mu\text{M}$ ] (y-Achse) der Zelllinien 786-O<sup>WT</sup> (blau) und 786-O<sup>PR</sup> (rot) (x-Achse) (Experiment 3)  
Mittelwerte aus 2 unabhängigen biologischen Replikaten, jeweils 3 technische Replikate pro Zelllinie



**Tabelle 22:** Berechnete IC50 [ $\mu\text{M}$ ] von 786-O<sup>WT</sup> und 786-O<sup>PR</sup> (Experiment 1 und 3)

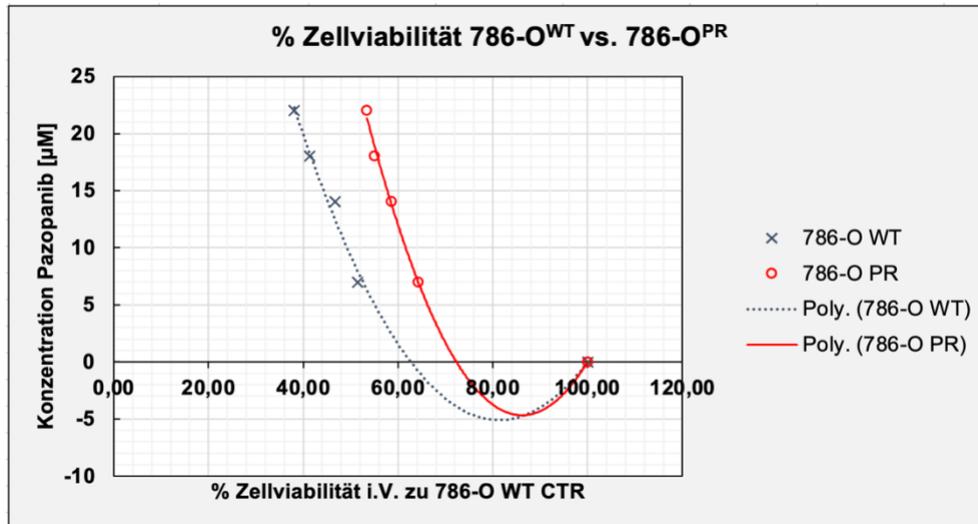
<b>IC 50</b>		
	<b>786-O<sup>WT</sup></b>	<b>786-O<sup>PR</sup></b>
<b>Experiment 1</b>	13,2 $\mu\text{M}$	20,4 $\mu\text{M}$
<b>Experiment 3</b>	24,6 $\mu\text{M}$	32,9 $\mu\text{M}$

Im Vergleich beider Zelllinien zeigt 786-O<sup>PR</sup> in beiden Experimenten eine höhere IC50 als 786-O<sup>WT</sup> (Tab. 22). 786-O<sup>PR</sup> weist nach wie vor eine Resistenz gegen Pazopanib auf.

Nach Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Experimenten 1 bis 3 und Auftragung der Zellviabilitätswerte (x-Achse) gegen die Pazopanib-Konzentration (y-Achse) wurde pro Zelllinie eine polynomische Trendlinie generiert (Abb. 30).

Entsprechend der Auswertung der Einzelergebnisse ergeben sich für 786-O<sup>WT</sup> und 786-O<sup>PR</sup> jeweils eine Annäherungsgleichung (Tab. 23). Anhand der Annäherungsgleichung wurde dann die IC50 berechnet (Abb. 31).

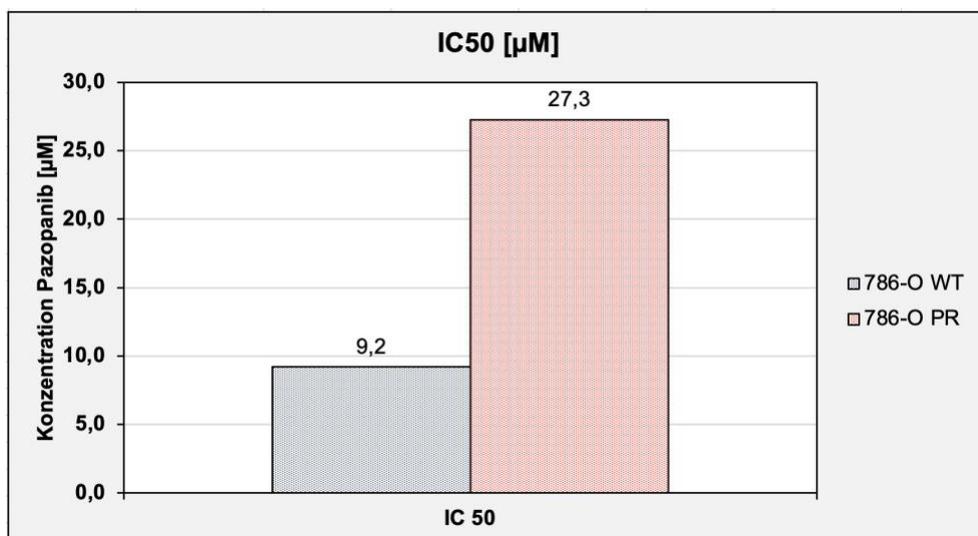
**Abbildung 30:** Konzentration Pazopanib [ $\mu\text{M}$ ] (y-Achse) mit korrespondierender Zellviabilität [%] (x-Achse) von 786-O<sup>WT</sup> (blau) und 786-O<sup>PR</sup> (rot) (Kombinierte Ergebnisse Experiment 1 – 3, n = 3) und zugehörige polynomische Trendlinien (Poly. (WT 1 und 2), Poly (Paz 1 und 2))  
 Polynomische Trendlinien generiert durch Microsoft® Excel®, Mittelwerte aus je 3 techn. Replikaten pro Zelllinie



**Tabelle 23:** Annäherungsgleichung und Bestimmtheitsmaß für polynomische Trendlinien  
 (Kombinierte Ergebnisse aus Experimenten 1-3, Polynomische Trendlinien generiert durch Microsoft® Excel®)

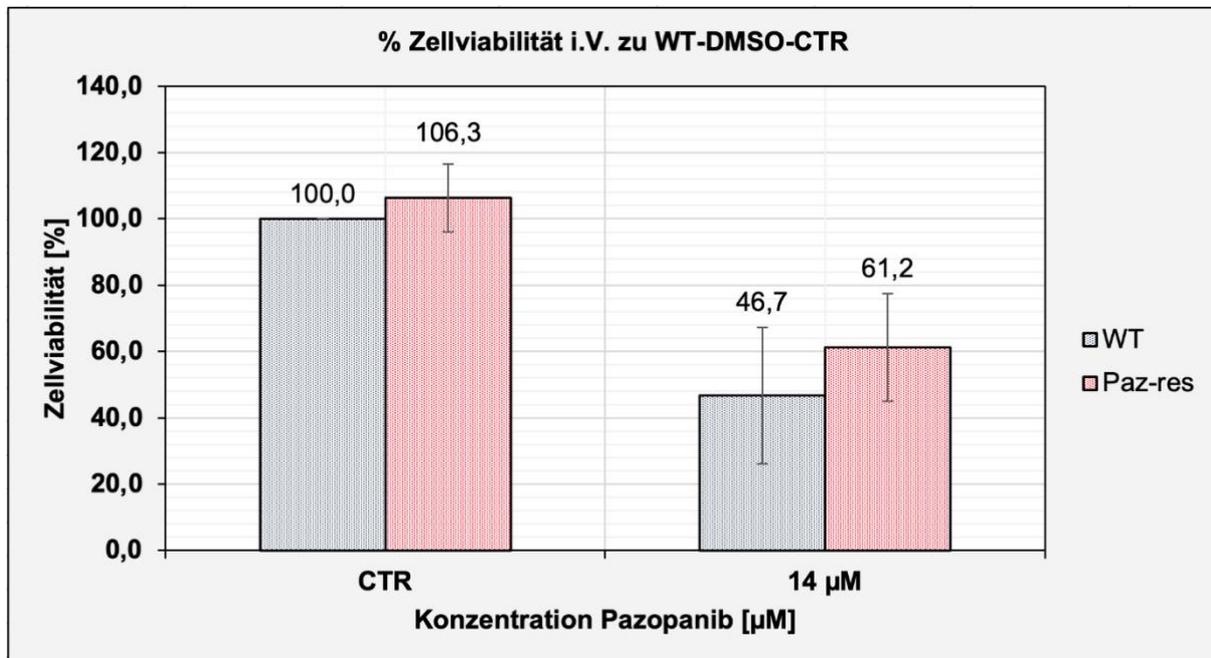
Experiment 1-3	Annäherungsgleichung	Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ )
786-O <sup>WT</sup>	$y = 0,0146x^2 - 2,3798x + 91,719$	0,9885
786-O <sup>PR</sup>	$y = 0,0244x^2 - 4,197x + 176,12$	0,9959

**Abbildung 31:** Berechnete IC50 [ $\mu\text{M}$ ] (y-Achse) der Zelllinien 786-O<sup>WT</sup> (blau) und 786-O<sup>PR</sup> (rot) (x-Achse)  
 (Kombinierte Ergebnisse Experiment 1 – 3, n = 3)  
 Mittelwerte aus 6 unabhängigen biologischen Replikaten pro Zelllinie, je 3 techn. Replikate pro Zelllinie



Die IC50 beträgt 9,2  $\mu\text{M}$  (786-O<sup>WT</sup>) im Vergleich zu 27,3  $\mu\text{M}$  (786-O<sup>PR</sup>) (Abb. 31).

**Abbildung 32:** % Zellviabilität der Zelllinien 786-O<sup>WT</sup> (blau) und 786-O<sup>PR</sup> (rot) in Prozent (y-Achse) nach 72-stündiger Behandlung mit Pazopanib [14 µM] (x-Achse) (Zusammenfassung Experiment 1-3) Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (n = 3), pro Experiment zwei biologische Replikate mit jeweils drei technischen Replikaten pro Zelllinie Kontrolle (CTR) enthielt DMSO [7%].



Bereits in der Kontrollgruppe zeigt 786-O<sup>PR</sup> eine leicht erhöhte Zellviabilität von 106,3% im Vergleich zu 786-O<sup>WT</sup>-Zellen.

Eine Behandlung mit Pazopanib dezimiert das Zellwachstum beider Zelllinien (Abb. 32). Unter Behandlung mit Pazopanib (14 µM) haben 786-O<sup>PR</sup> mit 61,2% jedoch eine höhere Zellviabilität als sensitive 786-O-Zellen mit 46,7% (p = 0,21).

In den Experimenten wurde nachgewiesen, dass eine Pazopanib-Konzentration von 14 µM die Zellviabilität von 786-O<sup>WT</sup> auf 50% reduziert. Damit entspricht die verwendete Konzentration von 14 µM der IC<sub>50</sub> von 786-O<sup>WT</sup>. 786-O<sup>PR</sup> zeigt bei dieser Konzentration im Vergleich ein höheres Überleben.

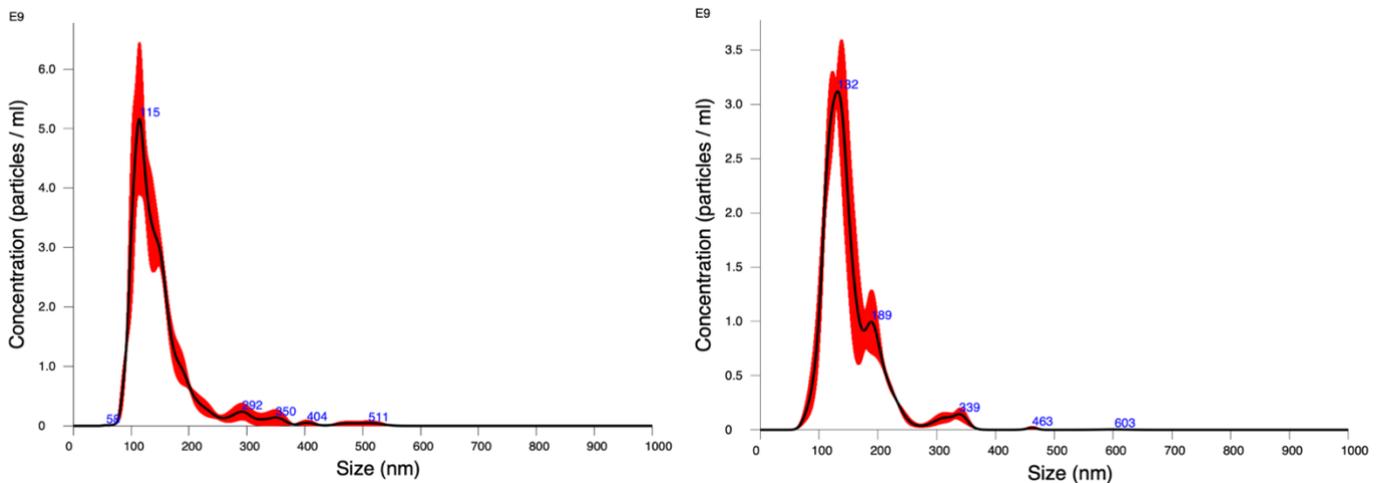
### 5.3 Isolation und Charakterisierung der Exosomen

Zunächst wurde die Qualität der Exosomenisolation überprüft.

#### 5.3.1 Nanoparticle tracking analysis (NTA)

Pro Zelllinie wurden jeweils zwei Proben mit unterschiedlichen Verdünnungen (1:100 und 1:500) gemessen, um die Messgenauigkeit zu erhöhen.

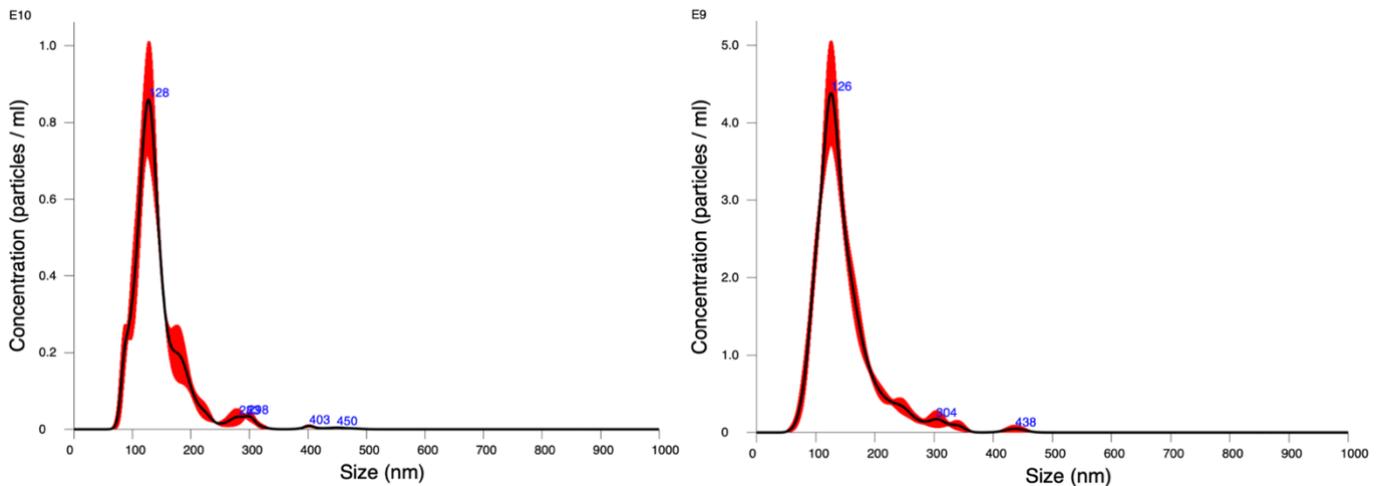
**Abbildung 33:** NTA-Messung der Exosomenkonzentration pro ml, Ergebnisse einer einzelnen Messung ( $n = 1$ ) Exosomen von 786-O<sup>WT</sup>: Verdünnung 1:500 (links), Verdünnung 1:100 (rechts)  
Konzentration der Partikel pro Milliliter (y-Achse) abhängig von der Partikelgröße in Nanometer (x-Achse)  
Peak des Graphen zeigt die Partikelgröße, deren Konzentration am höchsten (am häufigsten vorhanden) ist.



786-O<sup>WT</sup> zeigt in der Verdünnung 1:500 einen deutlichen Peak bei 115 nm (Abb. 33). Weitere kleine Peaks sind bei 292 nm, 350 nm und 404 nm zu erkennen.

In der niedrigeren Verdünnung 1:100 ist ein Peak bei 132 nm zu sehen. Hier wurden weitere Peaks bei 189 nm und 339 nm detektiert.

**Abbildung 34:** NTA-Messung der Exosomenkonzentration pro ml, Ergebnisse einer einzelnen Messung ( $n = 1$ )  
 Exosomen von 786-O<sup>PR</sup>: Verdünnung 1:500 (links), Verdünnung 1:100 (rechts)  
 Konzentration der Partikel pro Milliliter (y-Achse) abhängig von der Partikelgröße in Nanometer (x-Achse)  
 Peak des Graphen zeigt die Partikelgröße, deren Konzentration am höchsten (am häufigsten vorhanden) ist.



In der Messung von 786-O<sup>PR</sup>-Exosomen im Verdünnungsverhältnis 1:500 liegt ein deutlicher Peak bei 128 nm (Abb. 34). Ein weiterer Peak wird mit 290 nm angegeben.

In der niedrigeren Verdünnung (1:100) der 786-O<sup>PR</sup>-Exosomen ist der höchste Peak bei 126 nm zu sehen. Ein zweiter Peak ist bei 304 nm zu erkennen.

**Tabelle 24:** Messergebnisse der NTA, Exosomen von 786-O<sup>WT</sup> und 786-O<sup>PR</sup>  
 Ergebnisse einer einzelnen Messung ( $n = 1$ )

Verdünnung		786-O <sup>WT</sup> Partikel/ml	786-O <sup>PR</sup> Partikel/ml
1:100	Mittelwert +/- SD	153.6 +/- 4.2 nm	147.6 +/- 2.6 nm
	Modus +/- SD	134.0 +/- 6.5 nm	122.3 +/- 4.4 nm
1:500	Mittelwert +/- SD	150.5 +/- 3.3 nm	143.5 +/- 2.8 nm
	Modus +/- SD	116.6 +/- 7.8 nm	123.2 +/- 4.8 nm

Mit dem Konzentrations-Peak bei 115 nm (1:500) und 132 nm (1:100) für Exosomen von 786-O<sup>WT</sup> und für die Exosomen von 786-O<sup>PR</sup> mit einem Peak bei 128 nm (1:500) und 126 nm (1:100) entsprechen die Größen den in der Literatur gängigen Angaben von 50 – 150 nm (Tab. 24).

**Tabelle 25:** Gemessene Partikel/ml, Exosomen von 786-O<sup>WT</sup> und 786-O<sup>PR</sup>  
Ergebnisse einer einzelnen Messung (n = 1)

<b>Verdünnung</b>	<b>786-O<sup>WT</sup> Partikel/ml</b>	<b>786-O<sup>PR</sup> Partikel/ml</b>
<b>1:100</b>	$2,25 \cdot 10^{11}$	$3,23 \cdot 10^{11}$
Standard Error	$\pm 1,49 \cdot 10^{10}$	$\pm 1,72 \cdot 10^{10}$
<b>1:500</b>	$3,43 \cdot 10^{11}$	$5,27 \cdot 10^{11}$
Standard Error	$\pm 2,32 \cdot 10^{10}$	$\pm 4,16 \cdot 10^{10}$
<b>Mittelwerte</b>	$2,84 \cdot 10^{11}$	$4,25 \cdot 10^{11}$

Unabhängig von der Verdünnung sind in der Probe der 786-O<sup>PR</sup>-Exosomen mehr Partikel als in der Probe der 786-O<sup>WT</sup>-Exosomen enthalten (Tab. 25).

Um die Partikelkonzentrationen ins Verhältnis zu den vorhandenen Zellzahlen setzen zu können, wurden sowohl von 786-O<sup>WT</sup> als auch von 786-O<sup>PR</sup> nach Abnahme des ED-Mediums zur Exosomenisolation an Tag 8 bei 2 (786-O<sup>PR</sup>), beziehungsweise bei 3 (786-O<sup>WT</sup>) unabhängigen Experimenten die Zellzahlen bestimmt. Die Messungen der NTA geben die Partikelkonzentration pro Milliliter an. In den verwendeten Triple Flasks wurde für die gesamte Dauer der Experimente jeweils 80 ml des Zellkulturmediums verwendet, sodass die Partikelzahl mit 80 multipliziert werden muss, um die Gesamtpartikelzahl zu erhalten.

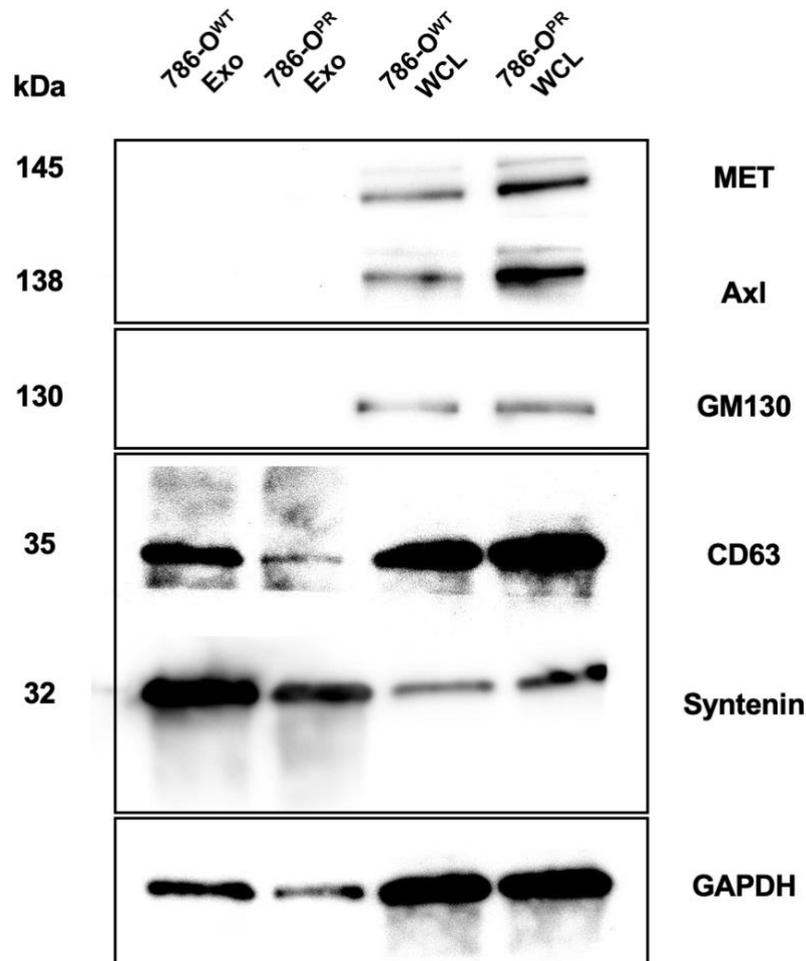
**Tabelle 26:** Partikel/Zelle von 786-O<sup>WT</sup> und 786-O<sup>PR</sup>

	<b>786-O<sup>WT</sup></b>	<b>786-O<sup>PR</sup></b>
Zellzahlen (Mittelwerte)	$3,47 \cdot 10^7$	$4,5 \cdot 10^7$
Gesamtpartikelzahl (Partikel/80 ml)	$2,27 \cdot 10^{13}$	$3,4 \cdot 10^{13}$
Partikel im Verhältnis zu Zellen	$6,5 \cdot 10^5$ Partikel/Zelle	$7,5 \cdot 10^5$ Partikel/Zelle

Auch im Verhältnis zur Zellzahl sezernieren 786-O<sup>PR</sup>-Zellen mehr Exosomen als 786-O<sup>WT</sup>-Zellen (Tab. 26).

### 5.3.2 Immunoblot

**Abbildung 35:** Immunoblots von 786-O<sup>WT</sup>-Exosomen/786-O<sup>WT</sup>-Zelllysate (WCL) und 786-O<sup>PR</sup>-Exosomen/786-O<sup>PR</sup>-Zelllysate (WCL) aus einem unabhängigen Experiment (n = 1)



Zur Überprüfung der Reinheit wurde die Expression des Markers GM130 untersucht. GM130 wurde in den Zelllysate-Proben beider Zelllinien nachgewiesen, in den Exosomenproben hingegen nicht. Zur weiteren Charakterisierung der Isolationsproben wurde die Expression der exosomalen Marker CD63, und Syntenin untersucht (Abb. 35). Beide Proteine wurden in den jeweiligen Isolationsproben von 786-O<sup>WT</sup> und 786-O<sup>PR</sup> exprimiert. Bei 786-O<sup>PR</sup>-Exosomen zeigt sich eine geringere Proteinkonzentration als bei 786-O<sup>WT</sup>-Exosomen, gemessen an den GAPDH-Konzentrationen. Zusätzlich wurde die Expression von MET und Axl untersucht. Beide Proteine wurden in den Zelllysateproben von 786-O<sup>WT</sup> und 786-O<sup>PR</sup> exprimiert, bei den Exosomenproben fehlt das Signal. Im dargestellten Blot ist bei Axl und MET in der Zelllysateprobe von 786-O<sup>PR</sup> ein deutlich stärkeres Signal zu erkennen als bei 786-O<sup>WT</sup>. Im Vergleich zur Loading Control mit GAPDH, die bei beiden Zelllinien ähnlich stark exprimiert wird, zeigt sich daher eine erhöhte Expression von Axl und MET bei 786-O<sup>PR</sup>, wobei das Signal bei Axl noch stärker ist als bei MET.

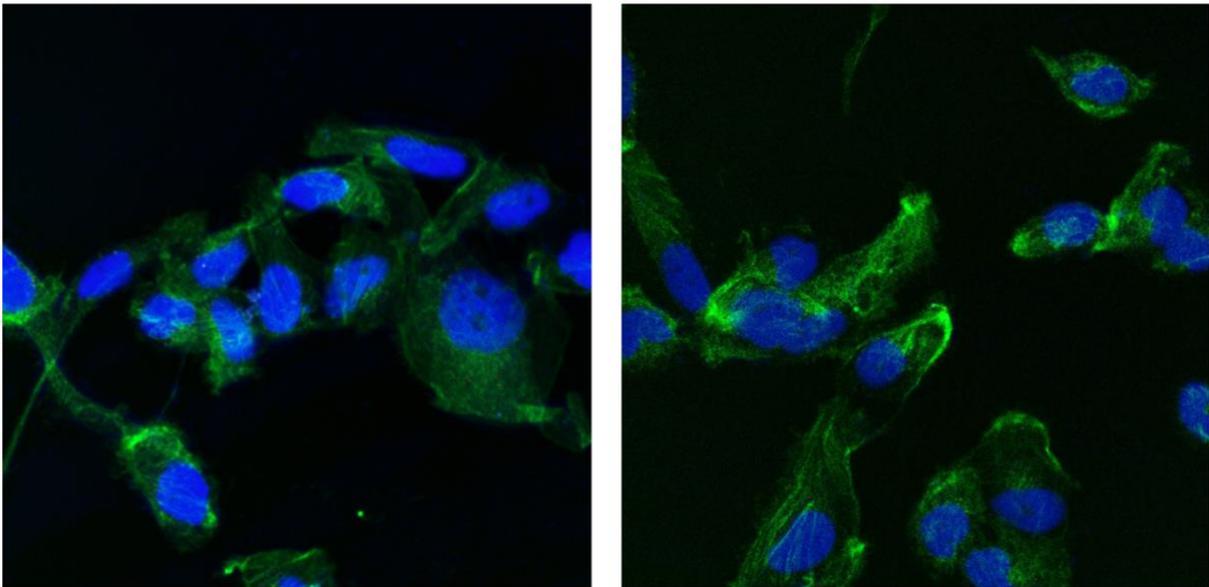
Es wurde auch die Expression von CD81 untersucht, jedoch kein Signal nachgewiesen.

#### 5.4 Nachweis der Aufnahme von Exosomen Pazopanib-resistenter 786-O-Zellen in sensitive 786-O-Zellen

Im dritten Teil der Arbeit wurde nachgewiesen, dass die Exosomen von 786-O<sup>PR</sup> in die sensitiven 786-O<sup>WT</sup>-Zellen aufgenommen worden sind (Abb. 37).

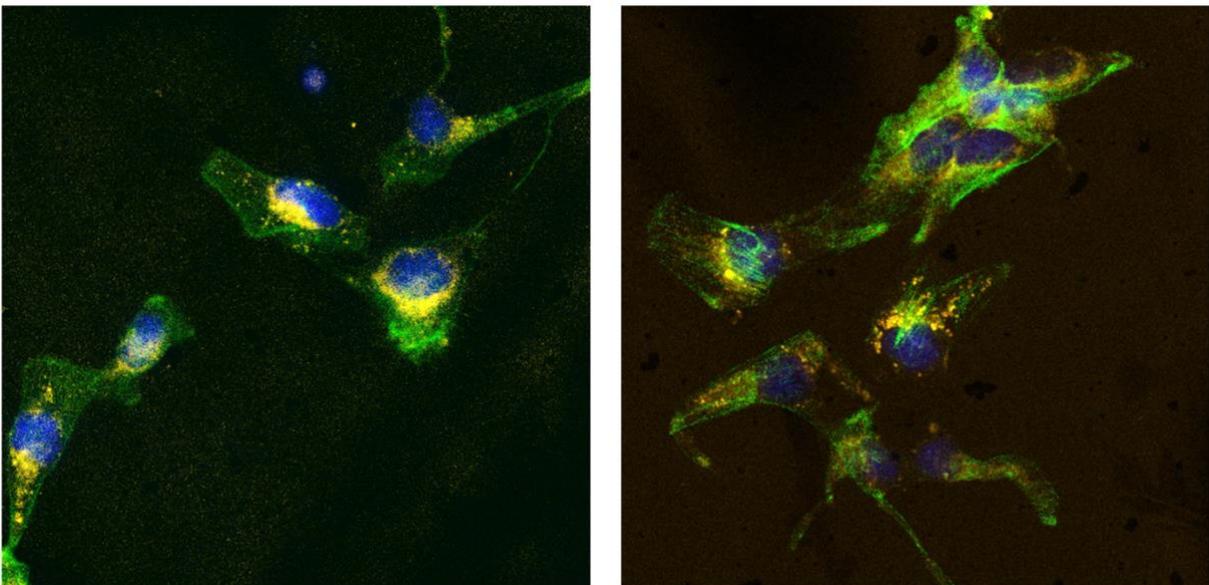
**Abbildung 36:** Nachweis der Aufnahme von Exosomen resistenter 786-O-Zellen in sensitive Zellen  
Negativkontrolle

786-O<sup>WT</sup>-Zellen (grün, F-Aktin) wurden für 24 Stunden mit PBS inkubiert. Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI.  
Bilder aufgenommen mit Laserscanning Mikroskop LSM 780 (Carl Zeiss AG)



**Abbildung 37:** Nachweis der Aufnahme von Exosomen resistenter 786-O-Zellen in sensitive Zellen  
786-O<sup>WT</sup>-Zellen (grün, F-Aktin) wurden für 24 Stunden mit Exosomen von 786-O<sup>PR</sup> (gelb) inkubiert.  
Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI.

Bilder aufgenommen mit Laserscanning Mikroskop LSM 780 (Carl Zeiss AG)

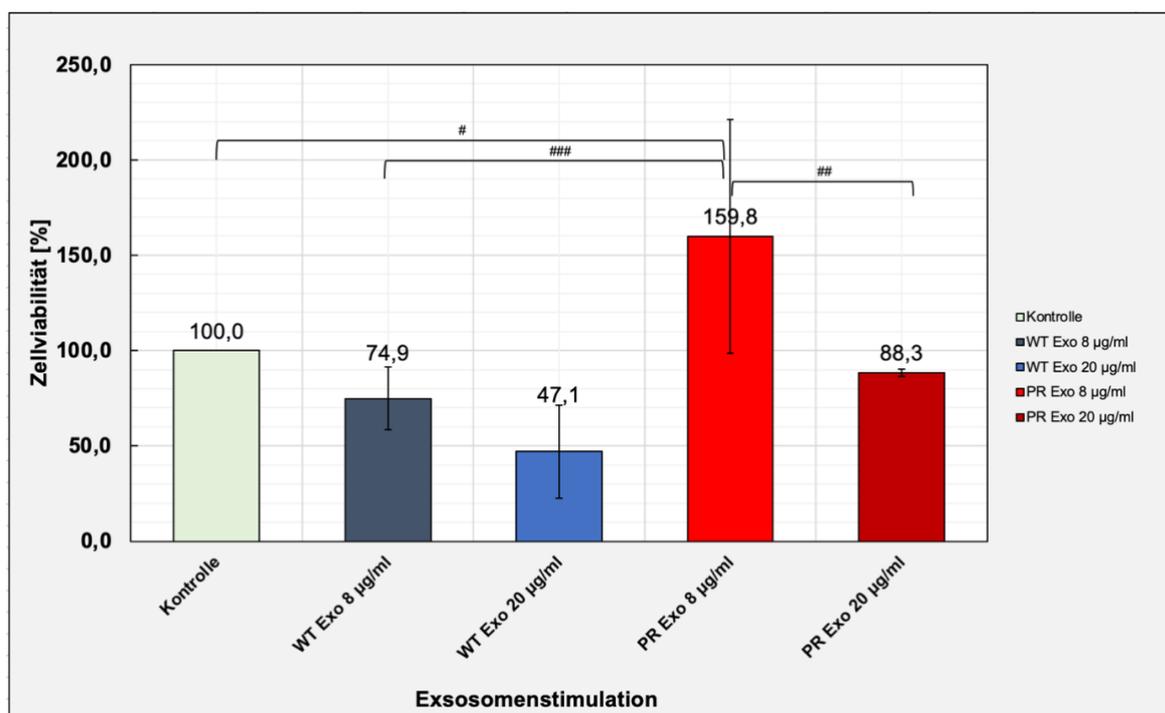


## 5.5 Analyse der Effekte der Exosomen resistenter 786-O-Zellen auf die Zellviabilität sensitiver Zellen

Nachdem eine Aufnahme der Exosomen in die Zellen nachgewiesen wurde, sollten im vierten Teil der Arbeit die Effekte der Exosomen auf die Zellviabilität von 786-O<sup>WT</sup>-Zellen analysiert werden.

Bei Stimulation mit Exosomen von 786-O<sup>WT</sup> nimmt die Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle (PBS) ab (Abb. 38, Experimente 1+2 zusammengefasst). Je höher die Exosomenkonzentration, desto stärker wird die Zellviabilität eingeschränkt. Bei Stimulation mit 8 µg/ml 786-O<sup>WT</sup>-Exosomen nimmt die Zellviabilität ab (100% auf 74,9% ( $p = 0,888$ )). Eine Stimulation mit 20 µg/ml 786-O<sup>WT</sup>-Exosomen führt zu einer weiteren Abnahme, sodass die Zellviabilität noch bei 47,1% liegt ( $p = 0,074$ ). Nach Stimulation mit 8 µg/ml 786-O<sup>PR</sup>-Exosomen steigt die Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle von 100% auf 159,8% an ( $p = 0,026$ ). Im Vergleich der Effekte von WT-Exosomen und PR-Exosomen (8 µg/ml) liegt eine signifikante Steigerung der Zellviabilität von 74,9% auf 159,8% vor ( $p < 0,001$ ). Eine Stimulation mit 20 µg/ml 786-O<sup>PR</sup>-Exosomen führt zu einer Senkung der Zellviabilität im Vergleich zur PBS-Kontrolle, die Zellviabilität liegt hier noch bei 88,3% ( $p = 0,999$ ). Eine höhere Konzentration von 786-O<sup>PR</sup>-Exosomen senkt die Zellviabilität von 159,8% auf 88,3% ( $p = 0,003$ ).

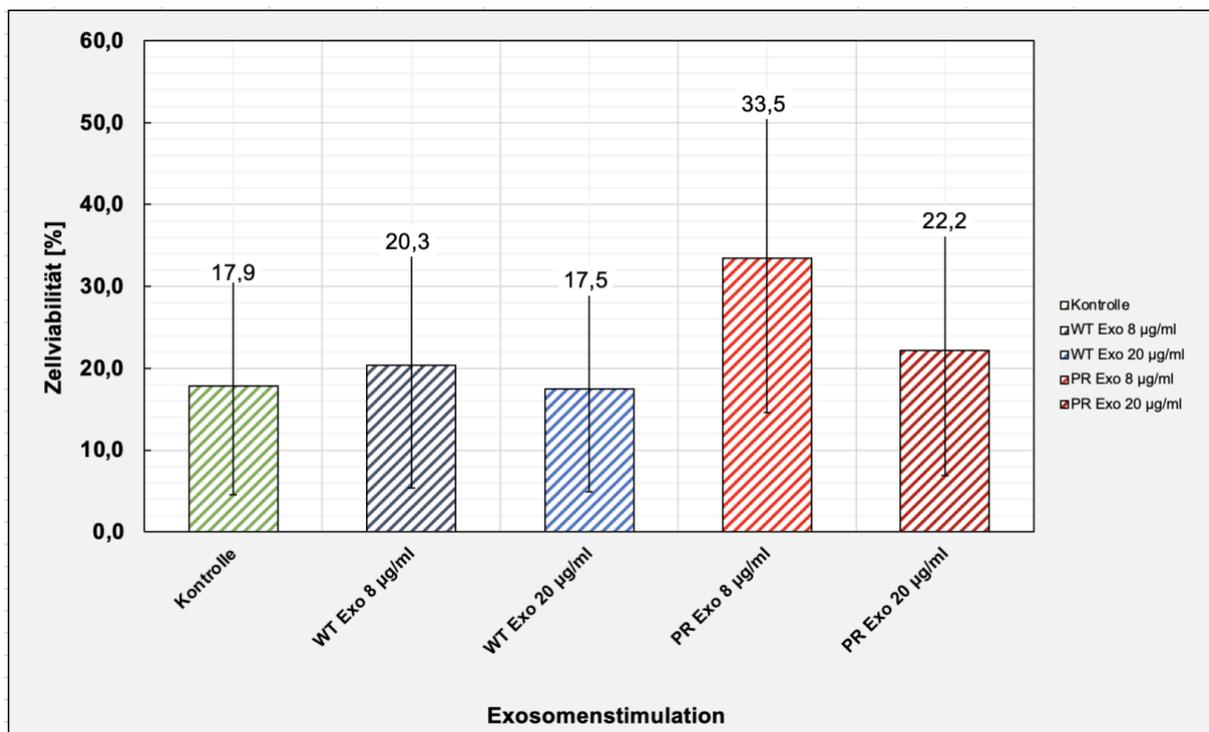
**Abbildung 38:** Zellviabilität [%] (y-Achse) von 786-O<sup>WT</sup>-Zellen nach Stimulation mit PBS (grün)/Exosomen von 786-O<sup>WT</sup> (blau) bzw. 786-O<sup>PR</sup> (rot) in den Konzentrationen 8 µg/ml und 20 µg/ml (x-Achse), anschließend Kultivierung mit DMSO-haltigem Zellkulturmedium (Kontrolle)  
Mittelwerte  $\pm$ SD berechnet aus den Ergebnissen von 2 unabhängigen Experimenten ( $n = 2$ )  
Zellviabilität der PBS-CTR wurde auf 100% normiert, die anderen Werte jeweils in Bezug zur CTR gesetzt  
Berechnung der p-Werte durch One-Way-ANOVA unter Verwendung des Tukey post-hoc-Tests  
#  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$



Die Behandlung mit Pazopanib senkt die Zellviabilität aller Zellen (Abb. 39, Experimente 1+2 zusammengefasst). Nach Stimulation mit 8  $\mu\text{g/ml}$  786- $\text{O}^{\text{WT}}$ -Exosomen erhöht sich die Zellviabilität etwas auf 20,3% ( $p = 1,0$ ). Bei höheren Konzentrationen der 786- $\text{O}^{\text{WT}}$ -Exosomen konnte kein Einfluss auf die Zellviabilität im Vergleich zur PBS-Kontrolle beobachtet werden (17,9% bei PBS-CTR, 17,5% bei 20  $\mu\text{g/ml}$  786- $\text{O}^{\text{WT}}$ -Exosomen ( $p = 1,0$ )).

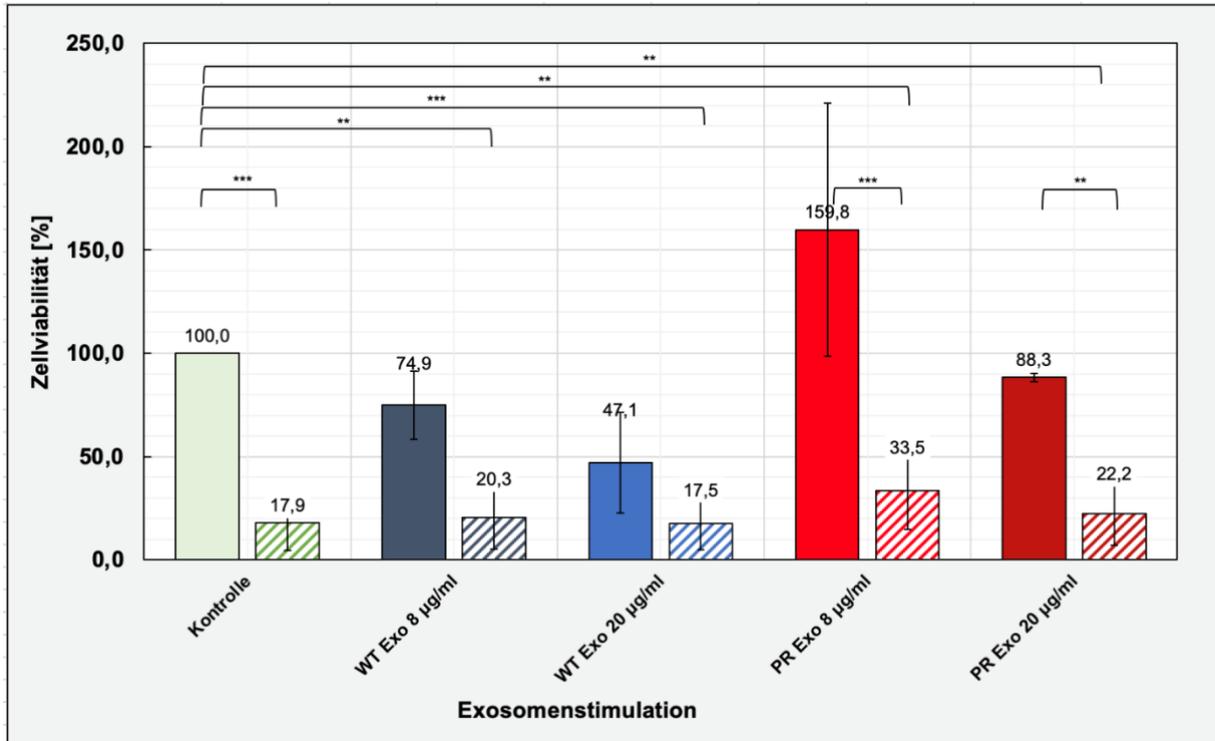
Nach Behandlung mit 786- $\text{O}^{\text{PR}}$ -Exosomen konnte eine Tendenz zur Steigerung der Zellviabilität unter Pazopanib-Behandlung beobachtet werden: Bei Exosomenkonzentrationen von 8  $\mu\text{g/ml}$  beträgt die Zellviabilität 33,5% ( $p = 0,995$ ), bei 20  $\mu\text{g/ml}$  22,2% ( $p = 1,0$ ).

**Abbildung 39:** Zellviabilität [%] (y-Achse) von 786- $\text{O}^{\text{WT}}$ -Zellen nach Stimulation mit PBS (grün)/Exosomen von 786- $\text{O}^{\text{WT}}$  (blau) bzw. 786- $\text{O}^{\text{PR}}$  (rot) in den Konzentrationen 8  $\mu\text{g/ml}$  und 20  $\mu\text{g/ml}$  (x-Achse), anschließend Behandlung mit Pazopanib [14  $\mu\text{M}$ ] für 72 Stunden  
Mittelwerte  $\pm$ SD berechnet aus den Ergebnissen von 2 unabhängigen Experimenten ( $n = 2$ )  
Zellviabilität der PBS-CTR (DMSO) wurde auf 100% normiert, die anderen Werte jeweils in Bezug zur CTR gesetzt



Die Zellviabilität nach Pazopanib-Behandlung sinkt in allen Untersuchungsarmen (Abb. 40, Experimente 1+2 zusammengefasst). Innerhalb der PBS-Kontrolle ( $p < 0,001$ ), sowie bei den Zellen, die mit Exosomen von 786- $\text{O}^{\text{PR}}$  stimuliert wurden, nahm die Zellviabilität signifikant ab (8  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,001$ ) und 20  $\mu\text{g/ml}$  ( $p = 0,009$ )). Die Effekte durch Pazopanib nach Stimulation mit Exosomen von 786- $\text{O}^{\text{WT}}$  waren für beide Konzentrationen nicht signifikant (8  $\mu\text{g/ml}$  ( $p = 0,058$ ) und 20  $\mu\text{g/ml}$  ( $p = 0,753$ )).

**Abbildung 40:** Zellviabilität [%] (y-Achse) von 786-O<sup>WT</sup>-Zellen nach Stimulation mit PBS (grün)/Exosomen von 786-O<sup>WT</sup> (blau) bzw. 786-O<sup>PR</sup> (rot) in den Konzentrationen 8 µg/ml und 20 µg/ml (x-Achse), anschließend Kultivierung mit DMSO-haltigem Zellkulturmedium (Kontrollgruppe, monochrome Säulen) oder Behandlung mit Pazopanib [14 µM] (schraffierte Säulen) für 72 Stunden  
Mittelwerte ±SD berechnet aus den Ergebnissen von zwei unabhängigen Experimenten (n = 2)  
Berechnung der p-Werte erfolgte durch One-Way-ANOVA unter Verwendung des Tukey post-hoc-Tests  
\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001

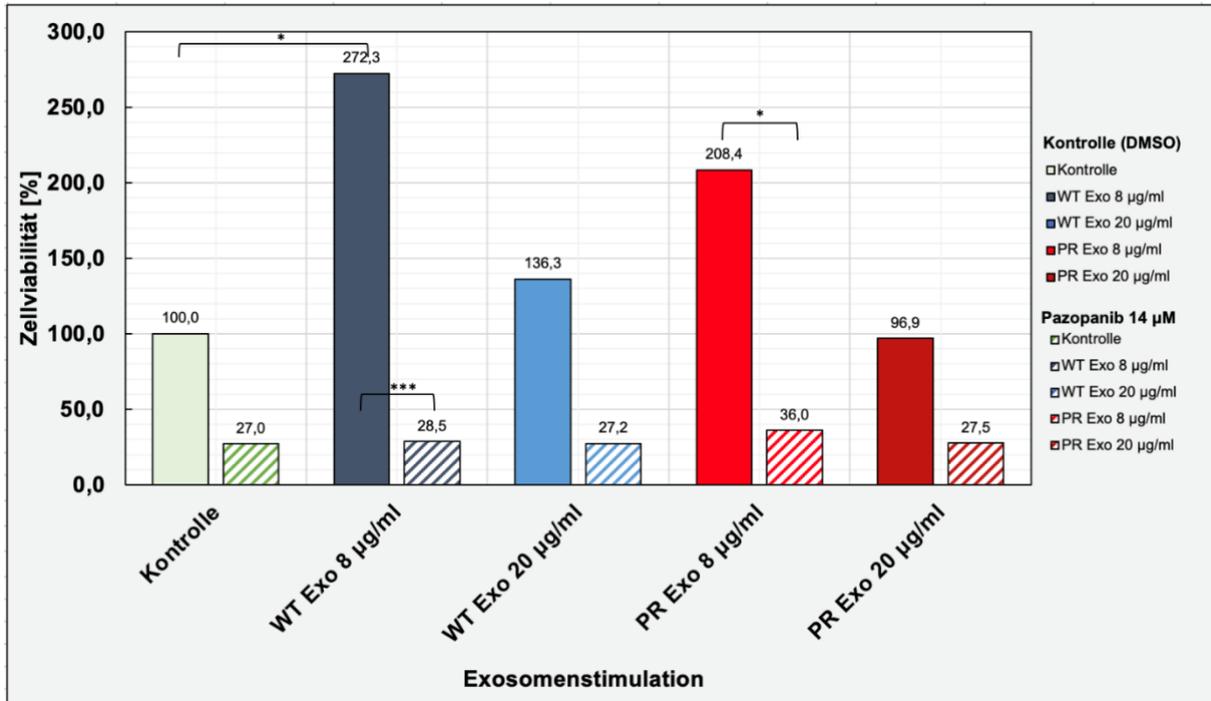


Im dritten Experiment zeigte sich nach Stimulation mit WT-Exosomen in der DMSO-Kontrolle eine Steigerung der Zellviabilität auf 272,3% bei einer Exosomenkonzentration von 8 µg/ml (p = 0,013) (Abb. 41). Bei höheren Konzentrationen von 20 µg/ml zeigt sich eine Tendenz zur Steigerung der Zellviabilität auf 136,6% (p = 0,995) im Vergleich zur Kontrolle mit PBS.

Unter Pazopanib-Behandlung ergibt sich keine Änderung der Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle mit PBS (p = 1,0).

Nach Stimulation mit Exosomen von 786-O<sup>PR</sup> zeichnet sich ein Trend zur Steigerung der Zellviabilität im Vergleich zur Kontrollgruppe ab. Die DMSO-Kontrolle zeigt bei Stimulation der 786-O<sup>WT</sup>-Zellen mit 8 µg/ml Exosomen von 786-O<sup>PR</sup> eine Zellviabilität von 208,4% (p = 0,262). Bei der höheren Konzentration von 20 µg/ml kann kein Einfluss auf die Zellviabilität beobachtet werden (100 % bei PBS-CTR, 96,9% nach 20 µg/ml 786-O<sup>PR</sup>-Exosomen, p = 1,0). Unter Pazopanib-Behandlung ist der Einfluss auf die Zellviabilität geringer ausgeprägt: bei niedriger Exosomenkonzentration kann die Zellviabilität im Vergleich zur PBS-Kontrolle tendenziell von 27,0% auf 36,0% leicht angehoben werden (p = 1,0). Bei höherer Exosomenkonzentration liegt kein Einfluss auf die Zellviabilität im Vergleich zur PBS-Kontrolle vor (p = 1,0).

**Abbildung 41:** Zellviabilität [%] (y-Achse) von 786-O<sup>WT</sup>-Zellen nach Stimulation mit PBS (grün)/Exosomen von 786-O<sup>WT</sup> (blau) bzw. 786-O<sup>PR</sup> (rot) in den Konzentrationen 8 µg/ml und 20 µg/ml (x-Achse), anschließend Kultivierung mit DMSO-haltigem Zellkulturmedium (Kontrollgruppe, monochrome Säulen) oder Behandlung mit Pazopanib [14 µM] (schraffierte Säulen) für 72 Stunden  
Mittelwerte ±SD berechnet aus den Ergebnissen eines unabhängigen Experiments (n = 1)  
Berechnung der p-Werte erfolgte durch One-Way-ANOVA unter Verwendung des Tukey post-hoc-Tests  
\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001



Nach Stimulation der 786-O<sup>WT</sup>-Zellen mit 8 µg/ml Exosomen von 786-O<sup>PR</sup> ist nach Behandlung mit Pazopanib ein Trend zur Steigerung der Zellviabilität im Vergleich zur PBS-Kontrolle zu erkennen (Abb. 42). Eine Stimulation mit der höheren Dosis resultiert wiederum in einer Senkung der Zellviabilität.

In der Kontrollgruppe mit DMSO resultiert eine Stimulation mit 786-O<sup>PR</sup>-Exosomen niedrigerer Konzentration (8 µg/ml) in einer Erhöhung der Zellviabilität von 100% auf 167,0% (p = 0,062). Bei Verwendung der höheren Exosomenkonzentration (20 µg/ml) wird die Zellviabilität im Vergleich zur PBS-Kontrolle allerdings um 10,4% auf 89,6% gesenkt (p = 0,998). Im Vergleich der Werte nach Stimulation der 786-O<sup>WT</sup>-Zellen mit 8 µg/ml und 20 µg/ml PR-Exosomen (DMSO) zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Zellviabilität (p = 0,02).

Die Behandlung mit Pazopanib senkt die Zellviabilität der PBS-Kontrolle sehr stark auf 19,2% (p = 0,013). Pazopanib senkt auch die Zellviabilität der stimulierten Zellen: Bei 8 µg/ml PR-Exosomen von 167,0% auf 33,8% (p < 0,001), bei 20 µg/ml PR-Exosomen sinkt die Zellviabilität unter Pazopanib von 89,6% auf 23,0% (p = 0,064).

Die Stimulation mit PR-Exosomen resultiert im Vergleich zur PBS-Kontrolle in einer tendenziell gesteigerten Zellviabilität. Bei einer Exosomenkonzentration von 8 µg/ml beträgt die Zellviabilität 33,8% im Vergleich zur PBS-Kontrolle (p = 0,988), bei 20 µg/ml 23,0% (p = 1,0).

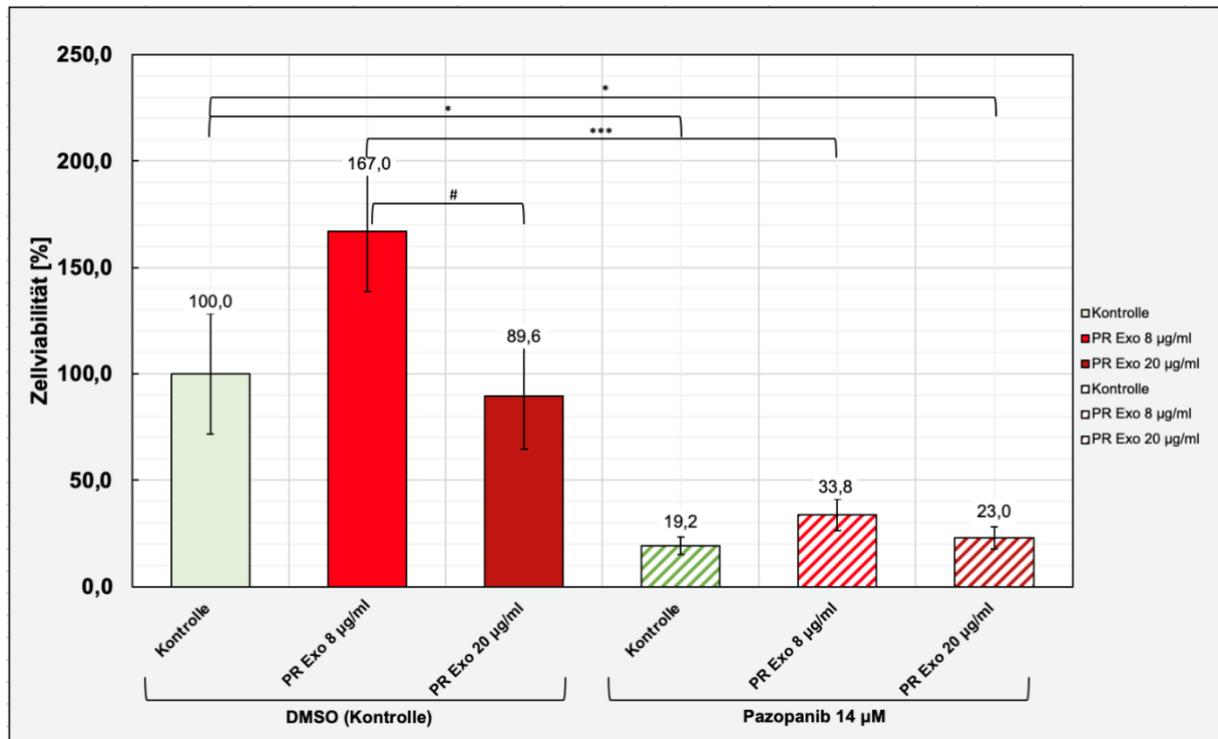
**Abbildung 42:** Zellviabilität [%] von 786-O<sup>WT</sup>-Zellen nach Stimulation mit PBS (grün)/Exosomen von 786-O<sup>PR</sup> (rot) in den Konzentrationen 8 µg/ml und 20 µg/ml (x-Achse), anschließend Kultivierung mit DMSO-haltigem Zellkulturmedium (Kontrollgruppe, monochrome Säulen) oder Behandlung mit Pazopanib [14 µM] (schraffierte Säulen) für 72 Stunden

Mittelwerte ±SD berechnet aus den Ergebnissen von drei unabhängigen Experimenten

Berechnung der p-Werte erfolgte durch One-Way-ANOVA unter Verwendung des Tukey post-hoc-Tests

\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 (Effekte von Pazopanib)

# p < 0,05, ## p < 0,01, ### p < 0,001 (Effekte der Exosomen)



## 6. Diskussion

Das Nierenzellkarzinom gehört zu den häufigsten Karzinomkrankungen der westlichen Welt und ist in Deutschland unter den zehn häufigsten Tumorentitäten zu finden [50,53]. Im metastasierten Tumorstadium steht derzeit eine systemische Therapie mit Checkpoint-, Tyrosinkinase- oder mTOR-Inhibitoren zur Verfügung [10,104]. Ein großes Problem stellt die Resistenzentwicklung gegen Tyrosinkinaseinhibitoren dar: Nach durchschnittlich 6 bis 15 Monaten zeigen nahezu alle Patienten eine Therapieresistenz gegen Tyrosinkinaseinhibitoren [143].

Zur Kommunikation der Zellen dienen unter anderem extrazelluläre Vesikel, mit denen DNA, RNAs, Lipide und Proteine zwischen Zellen transportiert werden können [79,166,178]. Die interzelluläre Kommunikation mittels kleiner extrazellulärer Vesikel, so genannter Exosomen, kann möglicherweise zur Entwicklung einer Therapieresistenz beitragen [11].

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Exosomen einer Pazopanib-resistenten Nierenzellkarzinomzelllinie einen Einfluss auf die Zellviabilität sensibler Zellen haben.

Für die weitere Verbesserung des Überlebens von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom ist es von großer Bedeutung, die Mechanismen der Resistenzentwicklung zu verstehen. Exosomen könnten hierbei als prädiktive Marker für das Therapieansprechen und eine mögliche Therapieresistenz fungieren.

### 6.1 Methodische Optimierung der Versuchsabläufe

Zu Beginn der Arbeitsphase im Labor wurden die Zellzahlen für die verschiedenen Experimente etabliert. Die Verwendung der korrekten Zellzahl für die Experimente ist wichtig für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander und gewährleistet darüber hinaus auch, dass die Ergebnisse der Experimente nicht durch zu hoch oder zu niedrig gewählte Zellzahlen verfälscht werden.

Für die Exosomenisolationen und die anschließende Durchführung der funktionellen Assays zur Überprüfung der Resistenzübertragung ist die Zellzahl ebenfalls von großer Bedeutung. Zu niedrig gewählte Zellzahlen in den Triple Flasks führen zu geringen Exosomenkonzentrationen im Zellkulturmedium, sodass nicht ausreichend Exosomen für die Stimulation der Zellen vorliegen. In den BCA-Ergebnissen der ersten Exosomenisolationen waren die Proteinkonzentrationen durchweg zu niedrig, um damit eine ausreichende Konzentration zur Stimulation der Zellen in den funktionellen Assays erreichen zu können. Für die folgenden Exosomenisolationen wurden daher zur Kultivierung der Zellen höhere Zellzahlen verwendet. Zu hoch gewählte Zellzahlen führen zu einer Überkonfluenz der Zellen.

Bei einer hohen Zelldichte kann es durch Kontaktinhibition zu einer Wachstumsverlangsamung oder einem Wachstumsstopp kommen [70]. Damit kann sich zum Einen die Sekretion von Exosomen reduzieren, zum Anderen führt dies möglicherweise auch zu einem Signalswitch innerhalb der produzierten Exosomen [63]. Um diese Einflüsse möglichst gering zu halten, wurden für die gesamte Dauer der Experimente stets gleichbleibende Zellzahlen verwendet.

Die Konfluenz der Zellen sollte am Tag der Abnahme des Exosomen-depletierten Mediums zur Exosomenisolation und an den Tagen des Zellsplittings etwa 90 - 95% betragen.

Zur Isolation von extrazellulären Vesikeln stehen neben der in dieser Arbeit verwendeten Ultrazentrifugation noch andere Methoden zur Verfügung. Dazu zählen beispielsweise die Polymer-Präzipitation, die oft in den Isolations-Kits verwendet wird, Isolationstechniken basierend auf Größenunterschieden (Size exclusion chromatography und Ultrafiltration) oder Immunoaffinity Chromatography, bei der das Prinzip der Antikörper-Bindung zur Isolation benutzt wird [179]. Die Methodenwahl hängt dabei von der weiteren Verwendung der Exosomen ab, als Goldstandard gilt jedoch derzeit die Ultrazentrifugation [179]. Die Exosomenisolation erfolgte anhand des etablierten Protokolls (Standard Operating Procedure, SOP) unserer Arbeitsgruppe, basierend auf einer differenziellen Zentrifugation mit anschließender Ultrazentrifugation.

Im fetalen Kälberserum (FCS), das als Bestandteil der Zellkulturmedien verwendet wurde, sind bereits extrazelluläre Vesikel vorhanden. Für die Exosomenisolation wurde zur Kultivierung der Zellen Exosomen-depletiertes FCS (ED-FCS) verwendet. So sollte eine Verfälschung der Ergebnisse durch die in FCS vorhandenen extrazellulären Vesikel ausgeschlossen werden. Der Entzug aller in FCS enthaltenen Exosomen kann allerdings auch einen hemmenden Einfluss auf die Migration und die Proliferation der Zellen haben [42,150]. Zusätzlich kann der abrupte Wechsel auf ED-FCS die Sekretion der Exosomen dezimieren [63]. Das Exosomen-depletierte Medium hat jedoch keinen direkten zytotoxischen Effekt innerhalb der ersten 48 Stunden [42]. In dieser Arbeit wurden 786-O-Zellen für 72 Stunden mit ED-FCS kultiviert und nach Abnahme des Zellkulturmediums zur Ultrazentrifugation nicht für Folgeexperimente verwendet. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte für Harnblasenkarzinomzellen ebenfalls kein signifikanter Einfluss auf die Zellviabilität durch Verwendung von ED-FCS im Vergleich zu normalem FCS nachgewiesen werden [13].

## 6.2 Bestätigung der Resistenz gegen Pazopanib in der Zelllinie 786-O nach Langzeitbehandlung

786-O<sup>PR</sup> zeigte bei steigenden Pazopanib-Konzentrationen im Vergleich zu 786-O<sup>WT</sup> durchweg eine höhere Zellviabilität. Die Resistenz spiegelt sich auch in einer deutlich gesteigerten IC50 für 786-O<sup>PR</sup> im Vergleich zu 786-O<sup>WT</sup> wider. Somit konnte die durch Langzeitbehandlung mit Pazopanib induzierte Therapieresistenz bewiesen werden.

Die Möglichkeit einer Resistenzinduktion gegen Tyrosinkinaseinhibitoren in vormals sensitiven Zellen wurde bereits mehrmals experimentell für unterschiedliche Karzinome nachgewiesen. Eine Langzeitbehandlung zweier Zelllinien eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC) mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib resultiert ebenfalls in einer Therapieresistenz [47]. Im Vergleich zu Erlotinib-sensitiven Zellen zeigte sich bei beiden Zelllinien konsekutiv eine 11- bis 22-fach höhere IC50 der Erlotinib-resistenten Zellen [47]. Vergleichbare Ergebnisse gibt es auch für den Tyrosinkinaseinhibitor Osimertinib bei Zelllinien eines NSCLC sowie für Crizotinib, Certinib und Alectinib [80,98]. In Bezug auf das Nierenzellkarzinom konnte ebenfalls eine Resistenzinduktion gegen den Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenib bei 786-O- und ACHN-Zellen nachgewiesen werden [71]. Nach sechsmonatiger Behandlung von 786-O wiesen die resistent gewordenen Zellen mit 24,5 µmol/l eine deutlich höhere IC50 für Sorafenib als die sensitiven Zellen mit 8,5 µmol/l auf. Bei resistenten ACHN-Zellen betrug die IC50 10,48 µmol/l im Vergleich zu 1,95 µmol/l bei sensitiven ACHN-Zellen. Die Dauer der Initialbehandlung betrug in der o.g. Publikation allerdings 6 Monate, während die Zellen in dieser Arbeit lediglich für 3 Monate kontinuierlich behandelt worden sind.

Nach Absetzen der Therapie erreichen die Zellen nach durchschnittlich 12 Wochen wieder die ursprüngliche Sensibilität gegen Tyrosinkinaseinhibitoren [59,60]. Dieser Effekt konnte auch experimentell validiert werden [47].

Daher wurde die Zelllinie 786-O<sup>PR</sup> für die gesamte Dauer der Experimente weiterhin kontinuierlich mit Pazopanib in einer Konzentration von 14 µM behandelt, um eine dauerhafte Resistenz der Zellen zu gewährleisten.

Zudem wurden die Experimente zur Resistenztestung und zur Analyse der Exosomeneffekte jeweils drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt, um die statistische Aussagekraft zu erhöhen. Zusätzlich wurden pro Experiment jeweils drei technische Replikate pro Zelllinie untersucht, um Effekte durch technische Fehler zu minimieren.

Im dritten Experiment zeigt sich eine vergleichsweise hohe Zellviabilität beider Zelllinien auch bei hohen Pazopanib-Konzentrationen (niedrigster Wert 56,5% bei 786-O<sup>WT</sup>, 22 µM), während im ersten Experiment die Zellviabilitätswerte unter 22 µM Pazopanib auf bis zu 25,4% (786-O<sup>WT</sup>) gesenkt wurden.

Bei Einzelauswertung der jeweiligen Experimente weisen die IC50-Werte eine große Spannweite auf. Die generierten polynomischen Trendlinien bei Zusammenführung der Einzelergebnisse der Experimente 1 bis 3 beschreiben die Daten im Vergleich zu den Trendlinien der Einzelexperimente am genauesten. Dies zeigt sich anhand der Determinationskoeffizienten von 0,9885 für 786-O<sup>WT</sup> und 0,9959 für 786-O<sup>PR</sup>, die beide nahezu 1 betragen.

Es wurde darauf geachtet, für die verschiedenen Experimente stets Zellen ähnlicher Passagen zu verwenden, um den Einfluss der Zellalterung möglichst gering zu halten. Alle Experimente zur Zellviabilität und des Resistenznachweises wurden bei Zellpassagen zwischen 60 und 71 durchgeführt. Die Reaktion der Zellen auf die Medikamentengabe kann zwischen den Experimenten jedoch variieren. Die große Streuung kann möglicherweise durch die Verwendung von Zellen niedrigerer Passage erklärt werden, die eine höhere Zellproliferationsrate aufweisen. Zusätzlich wurden unterschiedliche Chargen von Pazopanib-HCl verwendet. Ein Einfluss durch Herstellerunterschiede kann daher nicht ausgeschlossen werden. So sind möglicherweise auch paradoxe Reaktionen der Zellen auf höhere Pazopanib-Konzentrationen zu erklären, wie sie im zweiten Experiment zu beobachten waren.

Um mögliche Einflüsse durch variierende Medikamentenwirksamkeit gering zu halten, sollten in zukünftigen Experimenten alle Experimente mit Pazopanib ausschließlich einer Charge durchgeführt werden.

### 6.3 Isolation und Charakterisierung der Exosomen Pazopanib-sensitiver und Pazopanib-resistenter 786-O-Zellen

In der NTA-Messung wurde nachgewiesen, dass die isolierten Partikel den Größenordnungen der Exosomen entsprechen. Darüber hinaus wurde auch die Anzahl der sezernierten Partikel in Abhängigkeit der Zellzahl bestimmt. Hier fiel auf, dass die resistente Zelllinie 786-O<sup>PR</sup> mehr Exosomen sezerniert als 786-O<sup>WT</sup>.

Die Größenbestimmung der Exosomen erfolgte mithilfe der Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). Die Messung gibt sowohl die Größenverteilung als auch die Konzentration der einzelnen Partikel an [63]. Das Vorhandensein größerer Partikel führt zu einer geringeren Detektion kleinerer Partikel, da die Aufnahmekapazität der Kamera durch die größeren Partikel gesättigt ist [45,164]. Infolgedessen kann die Darstellung der Größenverteilung der Partikel verzerrt sein, wobei der Anteil großer Partikel über- und der Anteil kleiner Partikel unterschätzt wird [63]. Bei der Untersuchung derselben Exosomenprobe mit unterschiedlichen Standardmethoden zur Messung der Partikelgrößen und Partikelkonzentration können die Messergebnisse stark variieren, vergleicht man beispielsweise die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie, NTA und Durchflusszytometrie miteinander [164]. Die Schwankungen sind mit den technischen Limitierungen der jeweiligen Methode zu erklären, da die minimal detektierbare Partikelgröße der jeweiligen Messmethoden voneinander abweicht [164]. Für NTA-Messungen liegt die untere Nachweisgrenze bei 50 nm, kleinere Partikel können durch das Mikroskop nicht erfasst werden [163]. Daher sind die präsentierten Ergebnisse der NTA-Messungen unter Vorbehalt einer gewissen Messungsgenauigkeit zu betrachten.

Die Exosomen, die in der NTA gemessen wurden, waren in PBS resuspendiert und anschließend erneut mit PBS verdünnt. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurden die Vor- und Nachteile sowohl einer Fixierung der Exosomen in Paraformaldehyd als auch der Kryokonservierung besprochen. Aufgrund der Beobachtung einer Clusterbildung der Exosomen nach Kryokonservierung in vorangegangenen NTA-Messungen wurden die Exosomen unmittelbar vor der Messung isoliert. Auf eine Fixierung der Exosomen in Paraformaldehyd wurde verzichtet, da der zeitliche Abstand zwischen Exosomenisolation und NTA-Messung weniger als 48 Stunden betrug. Das Risiko eines möglichen Einflusses der PFA-Fixierung auf die Partikelgröße und -konzentration wurde daher eliminiert.

Diese Experimente müssen wiederholt werden, um statistisch valide Aussagen bezüglich der Konzentrationsunterschiede zwischen den resistenten und parentalen Zellen treffen zu können.

Mittels Immunoblot wurde die Expression der exosomalen Marker CD63 und Syntenin für Exosomen Pazopanib-sensitiver und -resistenter 786-O-Zellen nachgewiesen. Diese Beobachtung entsprach den erwarteten Ergebnissen.

Für das Tetraspanin CD63 als Transmembranprotein wird in Exosomen ebenso eine Anreicherung erwartet wie für Syntenin [111]. CD81 als weiterer Marker für Exosomen konnte hier nicht nachgewiesen werden. In der Chemolumineszenz-Detektion des Immunoblots wurde im CD81-markierten Bereich nach kurzer Belichtungszeit (ca. 5 Sekunden) kein Signal detektiert. Die zunächst vermutete Überlagerung der schwachen CD81-Bande durch das starke Signal anderer Marker hat sich nicht bestätigt. Selbst nach Erhöhung der Belichtungszeit auf 5 Minuten und einer Detektion über 60 Minuten konnte kein Signal nachgewiesen werden, das eindeutig CD81 zugeordnet werden konnte. Exosomale Marker lassen sich prinzipiell in ubiquitär vorkommende Proteine sowie spezifische Marker unterscheiden [41,157,179].

Als ubiquitär vorkommende Proteine für die Bildung und Sekretion von Vesikeln sind beispielsweise Hitzeschockproteine, Tetraspanine (CD63, CD81, CD9), ESCRT-abhängige Proteine (Alix) oder Integrine zu nennen. Spezifische Marker variieren entsprechend der Ursprungszelle der Exosomen und sind daher zellspezifisch (CD45, MHC) [165,179]. Die fehlende Expression von CD9 sowie die schwache Expression von CD81 bei 786-O stimmt mit den Ergebnissen von Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe überein [79].

Die Marker Axl und c-MET gehört zu einer Gruppe von Rezeptortyrosinkinasen, die die Zellproliferation, -invasion, -migration, -adhäsion und -überleben stimulieren [106,107]. In Vorarbeiten konnte nachgewiesen werden, dass ein hohes Expressionslevel von Axl gleichzeitig mit einer reduzierten Überlebensrate und Tumorprogression assoziiert ist [65,135]. Analog dazu wurde für c-MET ein erhöhtes Expressionslevel in Nierenzellkarzinomzellen gezeigt [54]. Auch in Bezug auf den Marker c-MET ist eine verstärkte Expression mit vermindertem Überleben und einer schlechteren Prognose assoziiert [54].

Sowohl in 786-O<sup>WT</sup> als auch in 786-O<sup>PR</sup> wurden Axl und c-MET in den jeweiligen Zelllysaten exprimiert.

Vergleichbare Ergebnisse bezüglich der zellulären Expression von Axl und c-MET gibt es auch für chronisch Sunitinib-behandelte 786-O-Zellen [180]. Dort zeigte sich nach Behandlung von 786-O mit Sunitinib nach 2 Wochen eine verstärkte Expression. Darüber hinaus wurden auch Downstream-Signalwege von Axl und c-MET, AKT und ERK aktiviert. Diese Signalwege fördern das Wachstum, das Überleben und die Stoffwechselfunktionen von Tumorzellen [1][7][117]. Durch Behandlung mit Cabozantinib konnte die durch Sunitinib induzierte Aktivierung von Axl und c-MET aufgehoben werden.

Eine Expression in den Exosomen der jeweiligen Zelllinien wurde hingegen nicht beobachtet. In Hinsicht auf die Expression von Axl und c-MET auf Exosomen liegen zum aktuellen Zeitpunkt keine vergleichbaren Arbeiten vor. Allerdings konnte für die Resistenz gegen den Tyrosinkinaseinhibitor Sunitinib in Bezug auf das Nierenzellkarzinom bereits gezeigt werden, dass eine Therapieresistenz über lange nicht-kodierende RNA (lncRNA) vermittelt wird [140]. Die lncRNA, genannt lncARSR (lncRNA Activated in RCC with Sunitinib Resistance), wird in Sunitinib-resistenten Zellen im Vergleich zu Sunitinib-sensitiven Zellen vermehrt gefunden. Über eine kompetitive Bindung der miRNA-34 und miRNA-449 werden AXL/c-MET hochreguliert, was zu einer konsekutiven Aktivierung der STAT3, AKT, und ERK-Signalwege führt. Die Möglichkeit einer Resistenzübertragung über exosomalen Transport von lncARSR auf sensitive Zellen wurde bewiesen [140]. Eine Resistenzübertragung mittels exosomaler lncRNA bei Sunitinib stellt demzufolge ebenfalls eine Hypothese zur Resistenzübertragung bei Pazopanib dar. So sind in den Exosomen möglicherweise nicht Axl und c-MET selbst exprimiert, jedoch aber die lncARSR, die dann indirekt zur Hochregulation von Axl und c-MET in den Zellen führt.

Um diese Hypothese weiter zu überprüfen, sollte eine Expressionsanalyse von lncRNA und auch anderen nicht-kodierenden RNAs wie miRNAs in 786-O<sup>WT</sup>- im Vergleich zu 786-O<sup>PR</sup> und der zugehörigen Exosomen durchgeführt werden. Einen möglichen Lösungsansatz für die Überwindung einer Therapieresistenz stellt eine Behandlung mit einer gegen lncARSR oder Axl/c-MET gerichteten Locked Nucleic Acid (LNA) dar [140]. Durch diese Behandlung konnte die Sunitinib-Sensitivität wieder hergestellt werden. Locked Nucleic Acid (Deutsch: verbrückte Nukleinsäure) bezeichnet eine künstliche Nukleinsäure mit modifizierten Nukleotiden. Eine Bestätigung des beschriebenen Zusammenhangs für Pazopanib-resistente RCC-Zellen stellt daher neben einer Erklärung der Resistenzentwicklung zusätzlich auch eine Therapieoption zur Beseitigung der Tyrosinkinaseinhibitorresistenz dar.

Eine quantitative Analyse des Expressionsunterschieds von Axl und c-MET zwischen 786-O<sup>WT</sup> WCL und 786-O<sup>PR</sup> WCL kann zusätzliche Hinweise bezüglich der Auswirkungen einer chronischen Pazopanib-Behandlung auf die Veränderungen der Signalwege liefern. Um die statistische Aussagekraft zu erhöhen, müsste eine mehrmalige Wiederholung der Expressionsanalyse erfolgen.

#### 6.4 Nachweis der Aufnahme von Exosomen resistenter 786-O-Zellen in sensitive Zellen

Eine Aufnahme der Exosomen resistenter 786-O-Zellen wurde nach Fluoreszenzfärbung und Inkubation für 24 Stunden mittels Laserscanner-Imaging sichtbar gemacht.

Eine Aufnahme von Exosomen in Zellen wurde für zahlreiche Karzinomzellen nachgewiesen, darunter für Mammakarzinom- oder Bronchialkarzinomzellen [28,98]. Darüber hinaus wurde auch die Internalisierung der Exosomen von TKI-resistenten Zellen mehrmals beobachtet [140,180]. Die verwendeten Farbstoffe und Detektionszeiten variieren allerdings innerhalb verschiedener Arbeiten. Bei unzureichender Entfernung des überschüssigen Fluoreszenzfarbstoffs kann es zu einer Nanopartikel-Bildung von PKH26 kommen [136]. Diese Nanopartikel sind ebenfalls fluoreszierend, ähneln der Partikelgröße der Exosomen und können auch in Zellen aufgenommen werden. Um eine genaue Aussage über die Aufnahme von PKH26-gefärbten Exosomen in Zellen treffen zu können, sollten anschließend an die Färbung der Exosomen mehrere Reinigungsschritte vorgenommen werden. Durch eine Dichtegradientenzentrifugation können die Nanopartikel von den Exosomen getrennt werden. So werden überschüssige Farbstoffe und unter Umständen entstandene fluoreszierende Nanopartikel entfernt. Im hier verwendeten Färbeprotokoll wurde die überschüssige PKH26-Farbe durch Zentrifugation in einem Pierce™ Protein Concentrator entfernt. Die Zentrifugation erfolgt hierbei durch eine semipermeable Polyethersulfon-Membran zur Aufkonzentrierung, Entsalzung und zum Pufferaustausch der Proben.

Die Bildgebung mittels Laserscanner wurde singulär und nur zu einem Zeitpunkt nach Inkubation (24 Stunden) durchgeführt. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe erfolgte eine Bildgebung nach mehreren Inkubationszeiträumen (1, 2, 4, 6, 12, 24 und 48 Stunden), um die zeitliche Komponente der Aufnahme der Exosomen in die Zellen genauer zu quantifizieren [13]. Nachdem in den ersten 6 Stunden die Mehrheit der Exosomen internalisiert wurden, nahm das Signal der Exosomen im Zeitraum zwischen 12 und 48 Stunden kontinuierlich ab. Anhand der Vorarbeiten mit Blasentumorzellen und Fibroblasten konnte der Aufnahmeprozess von Exosomen in die Zellen beobachtet werden. Aufgrund der verschiedenen Tumorentitäten ist das Zellverhalten jedoch nur bedingt vergleichbar, da die Aufnahmekapazitäten verschiedener Zelltypen variieren [81].

Der Messzeitpunkt wurde in dieser Arbeit nach 24 Stunden gewählt. Da viele diskutierte Effekte der Exosomen auf die Zellviabilität über posttranslationale Modifizierungen wirken, ist ein Effekt erst nach mehreren Stunden zu erwarten. Im Rahmen der funktionellen Assays erfolgte die Stimulation der Zellen mit Exosomen daher jeweils nach 24 Stunden an drei aufeinanderfolgenden Tagen. So sollten möglichst physiologische Bedingungen mit pulsatilem Exosomensezernationen simuliert werden. Die physiologischen Effekte von Exosomen auf die Zellviabilität und das Zellverhalten selbst erfolgen durch Genexpression und posttranslationale

Modifikationen. Durch die multiplen Exosomenstimulationen im Vergleich zu einer einzelnen Stimulation sollte darüber hinaus gewährleistet werden, dass diese Effekte wirken können. Ziel des Laserscanner-Imaging war es, die Aufnahme fluoreszenzmarkierter Exosomen in die 786-O-Zellen nachzuweisen. Die zeitliche Dynamik der Exosomenaufnahme war nicht Untersuchungsgegenstand dieses Experiments.

## 6.5 Analyse der Effekte der Exosomen auf die Zellviabilität

In den funktionellen Assays zur Überprüfung einer Resistenzübertragung durch extrazelluläre Vesikel zeichnete sich bei sensitiven 786-O-Zellen, die mit Exosomen Pazopanib-resistenter Zellen stimuliert wurden, ein Trend zu verbessertem Überleben ab.

Die Möglichkeit der Übertragung einer Therapieresistenz gegen Tyrosinkinaseinhibitoren durch extrazelluläre Vesikel wurde bereits mehrfach für verschiedene Karzinome beschrieben [28,80,98]. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen diesbezüglich mit bereits publizierten Ergebnissen überein.

Verglichen mit den Ergebnissen vorheriger Publikationen weisen die Ergebnisse dieser Arbeit einige Parallelen auf. Eine Stimulation sensitiver Zellen mit Exosomen TKI-resistenter Zellen führte bei Behandlung mit Pazopanib zu einer tendenziell gesteigerten Zellviabilität im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Diese Ergebnisse entsprechen den Effekten von Exosomen TKI-resistenter Zellen auf die Zellviabilität sensitiver Zellen bei nicht-klarzelligem Bronchialkarzinom [98]. Ein Transfer resistenter Exosomen führte zu einer signifikant gesteigerten Medikamentenresistenz bei vormals sensitiven NSCLC-Zellen. Für Zellen eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC) konnte unter Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Gefitinib (anti-EGFR) bereits ein verbessertes Überleben nach Stimulation mit Exosomen gezeigt werden [109]. Dabei wurden sensitive NSCLC-Zellen mit Exosomen einer Gefitinib-resistenten NSCLC-Zelllinie stimuliert und anschließend bei steigenden Gefitinibkonzentrationen die Zellviabilität in Prozent gemessen. Die mit Exosomen stimulierten Zellen zeigten eine deutlich höhere Zellviabilität und auch eine signifikant höhere IC50. Eine Stimulation der sensitiven Zellen mit eigenen Exosomen hatte keinen Einfluss auf die Zellviabilität.

Dies entspricht auch den Ergebnissen dieser Arbeit: Die Stimulation mit Exosomen TKI-sensitiver Zellen führte nur zu marginal verbessertem Überleben oder hatte gar keinen Effekt auf die Zellviabilität. Dieser Effekt wurde analog für den Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenib bei 786-O dargestellt: auch hier konnte durch Stimulation mit Exosomen sensitiver Zellen bei Sorafenib-Behandlung kein Effekt auf das Überleben der Zellen beobachtet werden [71].

Umgekehrt wurde für resistente NSCLC-Zellen auch untersucht, ob durch eine Stimulation der therapieresistenten Zellen mit Exosomen Gefitinib-sensitiver Zellen eine Sensitivität für Gefitinib übertragen werden kann. Dieser Effekt konnte nicht nachgewiesen werden [109]. Eine Übertragung der Medikamenten-Sensitivität wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, diese Hypothese sollte daher in kommenden Experimenten weiter überprüft werden.

Im experimentellen Aufbau unterscheidet sich die hier präsentierte Arbeit jedoch teilweise von denen bereits genannter Publikationen: Meist wurden die Effekte nach Stimulation mit Exosomen sensitiver und resistenter Zellen nur unter Medikamentenbehandlung untersucht. Teil dieser Arbeit war es auch, einen möglichen Einfluss der Exosomen sensitiver Zellen auf die Zellviabilität im Generellen, also ohne die Einwirkung eines Medikaments, zu untersuchen. So sollte überprüft werden, ob die Zellviabilität bereits durch Zugabe von Exosomen der eigenen Zellen beeinflusst werden kann. Hierfür zeigte sich in den ersten beiden Experimenten eher ein Trend zu verringerter Zellviabilität. Im dritten Experiment hingegen konnte durch Stimulation mit sensitiven Exosomen eine Verbesserung des Überlebens erzielt werden, die die Effekte der resistenten Exosomen sogar übertraf.

Im Gegensatz zu den Vorexperimenten wurden im dritten Experiment Exosomen verwendet, die unmittelbar vor der Stimulation isoliert wurden. Somit entfiel der Zwischenschritt der Kryokonservierung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ , der bei den Vorexperimenten aufgrund der Planung der Experimente unumgänglich war. Aufgrund dieses Unterschieds im experimentellen Ablauf sind die Ergebnisse auch nur bedingt vergleichbar. In NTA-Messungen unserer Arbeitsgruppe wurde beobachtet, dass Exosomen nach Kryokonservierung dazu neigen, Konglomerate zu bilden. Hierdurch kann der Aufnahmeprozess der Exosomen in die Zellen beeinflusst sein. Die beobachteten Unterschiede sind daher möglicherweise mit dem Vorgang der Kryokonservierung in Verbindung zu verbringen. Eine 2-monatige Kryokonservierung von Exosomen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  resultiert zwar in morphologischen Veränderungen, die biologische RNA-Aktivität der Exosomen wird allerdings nicht beeinträchtigt [174].

Im direkten Vergleich der Absorptionswerte der WST-1-Assays fielen im Rahmen der funktionellen Assays deutlich niedrigere Werte auf als bei vorherigen Experimenten. Bereits die mikroskopische Betrachtung der 786-O-Zellen vor Durchführung der WST-1-Assays zeigte eine starke Abnahme der Zelldichte. Im Vergleich zu Vorexperimenten ohne Exosomenstimulation und zwischenzeitliches Subkultivieren der Zellen war die Konfluenz der Zellen sehr niedrig. Auch die berechneten Zellviabilitätswerte lagen mit etwa 17% nach Pazopanibbehandlung deutlich unter den Werten, die in den Vorexperimenten beobachtet wurden. In den Experimenten zur Überprüfung der Resistenz gegen Pazopanib lag die Zellviabilität von 786-O<sup>WT</sup> nach Behandlung mit Pazopanib noch bei circa 47%. Die Zytotoxizität von Pazopanib ist demnach in den funktionellen Assays viel stärker ausgeprägt als in den Vorexperimenten.

Dieser Effekt liegt womöglich im Versuchsablauf begründet. Die Stimulation der Zellen mit Exosomen erfolgte über 2 Tage, an Tag 4 wurden die stimulierten Zellen subkultiviert und anschließend in eine 96-Well-Platte ausgesät. Danach wurden die Zellen ein drittes Mal mit Exosomen stimuliert und erst 24 Stunden später für 72 Stunden mit Pazopanib behandelt.

Durch die zusätzliche Strapazierung der Zellen durch den Zwischenschritt des Subkultivierens können negative Folgen auf das Überleben und die Proliferation der Zellen nicht ausgeschlossen werden. Möglicherweise ist auch der Zwischenschritt des Subkultivierens für die oben beschriebene starke Verminderung des Zellüberlebens zum Zeitpunkt des WST-1-Assays verantwortlich. In zukünftigen Experimenten könnte durch den Verzicht auf das Subkultivieren der Zellen eine Beeinflussung der Zellviabilität minimiert werden.

Alle Experimente zur Analyse der Exosomeneffekte wurden innerhalb der Passagen 61 bis 68 durchgeführt. Nach Beendigung des jeweiligen Experiments wurden die verwendeten Zellen verworfen und neue Zellen aus dem Zellstock aufgetaut, um Einflüsse durch Zellalterung möglichst gering zu halten. Auch für die hier durchgeführten Experimente wurde darauf geachtet, stets gleichbleibende Zellzahlen zu verwenden.

In Zusammenschau der Ergebnisse zeigt sich ein dosisabhängiger Effekt der Exosomen auf die Zellviabilität. Die größten Veränderungen der Zellviabilität waren bei der niedrigeren Exosomenkonzentration von 8 µg/ml zu sehen. Bei der höheren Konzentration von 20 µg/ml ist der Effekt auf die Zellviabilität weniger stark ausgeprägt oder entfällt vollständig. Eine Stimulation der Zellen mit einer höheren Exosomenkonzentration kann die Zellviabilität nicht weiter steigern.

In vergleichbaren Arbeiten zur Möglichkeit der Resistenzübertragung durch extrazelluläre Vesikel wurde meist nur eine Exosomenkonzentration untersucht. Die verwendeten Konzentrationen in den genannten Publikationen schwankten hierbei zwischen 10 µg/ml [98] und 20 µg/ml [28,71]. Damit entsprachen die Konzentrationen der Größenordnung der in dieser Arbeit verwendeten Exosomenkonzentrationen. Zusätzlich erfolgte die Stimulation mit Exosomen oft als Einmalgabe in hoher Dosis [71,82,109]. Die hier durchgeführte, repetitive Exosomenstimulation entspricht im Vergleich zu der einmaligen Stimulation mit Exosomen eher dem physiologischen Zustand pulsatiler Sekretion.

In Vorarbeiten konnte bezüglich der Aufnahme von Exosomen in Zellen bereits eine Dosisabhängigkeit nachgewiesen werden [18,21,49,90]. Ein Sättigungseffekt konnte nicht zwangsläufig beobachtet werden, auch bei Dosen über 100 µg/ml [18]. Im Vergleich der Exosomenaufnahme bei verschiedenen Zelllinien jedoch zeigte sich ein für die jeweilige Zelllinie spezifischer dosisabhängiger Verlauf [21]. In der Arbeit von Busatto et al. wurde bei steigenden Exosomenkonzentrationen der prozentuale Anteil fluoreszierender Zellen untersucht. Bei hohen Exosomenkonzentrationen konnte bei einigen Zelllinien eine Abflachung der Kurve beobachtet werden. Daraus wurde geschlossen, dass bei höheren Konzentrationen die Aufnahme hauptsächlich über unspezifische Aufnahmemechanismen erfolgt. Bei anderen untersuchten Zelllinien hingegen zeigte sich ein weiterhin tendenziell

steigender Kurvenverlauf. Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass für verschiedene Zelllinien mit individuell unterschiedlichen Exosomenkonzentrationen gearbeitet werden sollte. Im Fall der vorliegenden Arbeit kann daher die höhere Exosomenkonzentration von 20 µg/ml bereits die Dosis sein, bei der ein Sättigungseffekt eintritt. Um dies weiter zu evaluieren, sollten zusätzliche Experimente zur Dosisfindung angeschlossen werden.

Die Aussage eines in vitro durchgeführten Experiments ist immer nur bedingt auf die in vivo Situation übertragbar. Weitere Analysen der Effekte von Exosomen in vivo sind daher unerlässlich.

Im Hinblick auf das Nierenzellkarzinom wurde sowohl für 786-O- als auch für ACHN-Zellen eine Übertragung der Resistenz gegen Sorafenib beschrieben, wie bereits oben dargestellt [71]. In weiteren Analysen dieser Exosomen wurde deutlich, dass die Expressionslevel von 17 verschiedenen miRNAs in den Exosomen resistenter 786-O-Zellen im Vergleich zu sensitiven Zellen um mehr als das doppelte hochreguliert waren [71]. Insbesondere für miR-31-5p wurden bezüglich einer Sorafenib-Resistenz bei 786-O die höchsten Expressionslevel nachgewiesen.

Die Rolle der miRNAs im Nierenzellkarzinom wird derzeit ausgiebig erforscht. Hierbei konnten bereits zahlreiche miRNAs identifiziert werden, die mit der Prognose assoziiert sind [61,129,138,147]. Für metastasierte Nierenzellkarzinome konnte eine herabgesetzte Expression verschiedener miRNA gezeigt werden, dazu zählen beispielsweise miR-10a, miR-10b, miR-29a, miR-221 und miR-451 [72]. Eine Hochregulation von miRNA-23a-3p oder miRNA-486 wurde mit einem reduzierten Gesamtüberleben bei Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom assoziiert [72]. Da verstärkte Expressionslevel einiger miRNAs mit einer schlechteren Prognose verknüpft sind, können individuell bestimmte Expressionslevel ebenjener miRNAs möglicherweise auch als prognostische Marker relevant werden [61,73,141]. In derzeitiger Ermangelung eines spezifischen Tumormarkers für das Nierenzellkarzinom wäre dies von großer Bedeutung.

Das genaue Verständnis der molekularen Mechanismen einer Übertragung der Therapieresistenz gegen Tyrosinkinaseinhibitoren ist für die Überwindung einer Resistenz unerlässlich. In dieser Arbeit wurde die Möglichkeit der Resistenzübertragung durch exosomale Kommunikation der Tumorzellen untereinander untersucht, die dabei ablaufenden molekularen Prozesse müssen allerdings weiterhin eingehend erforscht werden.

## 7. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die vorliegende Arbeit bestätigt eine Beteiligung von Exosomen an der Vermittlung einer Therapieresistenz bei Nierenzellkarzinomzellen. Es konnte nachgewiesen werden, dass durch Langzeitbehandlung mit Pazopanib eine Resistenz in vormals sensitiven Zellen induziert werden kann und die sezernierten Exosomen in sensitive Zellen aufgenommen werden. Zusätzlich zeigen die Analysen, dass neben Exosomen resistenter Zellen auch die Exosomen sensitiver Zellen das Überleben sensitiver Zellen beeinflussen. Jedoch sind die beobachteten Unterschiede nicht statistisch signifikant und können daher lediglich als Trend beurteilt werden.

Um die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit zu validieren, sind daher weitere Experimente notwendig. Durch eine Umstrukturierung des Versuchsablaufs können mögliche Fehlerquellen minimiert und die Aussagekraft der Ergebnisse verbessert werden. Eine Optimierung der Methode zur Exosomenisolation würde es z.B. erlauben, auf den Zwischenschritt der Kryokonservierung zu verzichten und so mögliche Veränderungen der Exosomenstruktur und -funktion auszuschließen.

Im weiteren Verlauf sollte die Expression von lncRNA und das miRNA-Profil in 786-O<sup>WT</sup>- und 786-O<sup>PR</sup>-Zellen untersucht und verglichen werden, um zusätzlich zum Verständnis molekularer Mechanismen der Resistenzentwicklung möglicherweise auch einen Ansatz zur Überwindung der Therapieresistenz zu etablieren.

Eine genauere Charakterisierung der Exosomen resistenter Tumorzellen kann ebenfalls dazu dienen, prädiktive Marker des Nierenzellkarzinoms zu finden, mithilfe derer möglicherweise auch das Therapieansprechen überwacht werden kann. Aufgrund des einfachen und wenig invasiven Zugangs zu Untersuchungsmaterial wären Exosomen aus dem Blut als prädiktive Marker hervorragend geeignet. Dadurch wäre eine individuelle Therapieanpassung möglich. Durch die Überwindung oder sogar Prävention einer Resistenzentwicklung unter Therapie könnte das Überleben von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom weiter verbessert werden. Wenn eine zielgerichtete systemische Therapie weiterhin wirksam bleibt, kann so womöglich der Metastasierungsprozess verlangsamt oder die weitere Metastasierung sogar gestoppt werden.

## 8. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten nach Geschlecht, ICD-10 C64, Deutschland 1999 – 2018/2019, Prognose (Inzidenz) bis 2022, modifiziert [53] .....	8
<b>Abbildung 2:</b> Relatives 5-Jahres-Überleben nach UICC-Stadium und Geschlecht modifiziert nach [53] .....	15
<b>Abbildung 3:</b> Hypoxia-inducible Factor (HIF)-regulierte Prozesse modifiziert nach [91] .....	19
<b>Abbildung 4:</b> Überexpression von VEGF und PDGF durch Akkumulation von HIF modifiziert nach [75].....	20
<b>Abbildung 5:</b> VHL-Inaktivierung beim klarzelligen Nierenzellkarzinom und Bedeutung für systemische Therapie modifiziert nach [83].....	21
<b>Abbildung 6:</b> Signaltransduktion von Tyrosinkinase-regulierten Prozessen modifiziert nach [58] .....	22
<b>Abbildung 7:</b> Angriffspunkte der systemischen Therapie modifiziert nach [30] .....	23
<b>Abbildung 8:</b> Anti-angiogenetische Medikamente und ihre Zielstrukturen modifiziert nach [9] .....	25
<b>Abbildung 9:</b> Rolle von c-KIT in der Signaltransduktion und Hemmung durch TKIs modifiziert nach [1] .....	26
<b>Abbildung 10:</b> Synthese und Sekretion von Exosomen modifiziert nach [137] .....	28
<b>Abbildung 11:</b> Aufbau und Zusammensetzung von Exosomen modifiziert nach [108] .....	30
<b>Abbildung 12:</b> Aufnahme von Exosomen in die Empfängerzelle modifiziert nach [166] .....	31
<b>Abbildung 13:</b> Übertragung der Sunitinib-Resistenz durch exosomalen Transport von lncARSR modifiziert nach [140] .....	33
<b>Abbildung 14:</b> Belegung der 96-Well-Platte (Etablierung der LC50) .....	47
<b>Abbildung 15:</b> Belegung der 12-Well-Platte .....	54
<b>Abbildung 16:</b> Stimulation der 12-Well-Platte mit Exosomen .....	55
<b>Abbildung 17:</b> Belegung der 96-Well-Platte (Funktionelle Assays) .....	56
<b>Abbildung 18:</b> Belegung der Kammerobjektträger .....	57
<b>Abbildung 19:</b> Konfluenz von 786-O <sup>WT</sup> am Tag der Abnahme des Exosomen-depletierten Mediums (beispielhaft) .....	60
<b>Abbildung 20:</b> Konfluenz von 786-O <sup>PR</sup> am Tag der Abnahme des Exosomen-depletierten Mediums (beispielhaft) .....	61
<b>Abbildung 21:</b> % Zellviabilität der Zelllinien 786-O <sup>WT</sup> (blau) und 786-O <sup>PR</sup> (rot) in Prozent (y-Achse) nach 72-stündiger Behandlung mit Pazopanib unter verschiedenen Konzentrationen (x-Achse) (Experiment 1) Mittelwerte aus 2 unabhängigen biologischen Replikaten, je 3 techn. Replikate pro Zelllinie Kontrolle (CTR) enthielt DMSO [7%] .....	63
<b>Abbildung 22:</b> % Zellviabilität der Zelllinien 786-O <sup>WT</sup> (blau) und 786-O <sup>PR</sup> (rot) in Prozent (y-Achse) nach 72-stündiger Behandlung mit Pazopanib unter verschiedenen Konzentrationen (x-Achse) (Experiment 2) Mittelwerte aus 2 unabhängigen biologischen Replikaten, je 3 techn. Replikate pro Zelllinie Kontrolle (CTR) enthielt DMSO [7%] .....	64
<b>Abbildung 23:</b> % Zellviabilität der Zelllinien 786-O <sup>WT</sup> (blau) und 786-O <sup>PR</sup> (rot) in Prozent (y-Achse) nach 72-stündiger Behandlung mit Pazopanib unter verschiedenen Konzentrationen (x-Achse) (Experiment 3) Mittelwerte aus 2 unabhängigen biologischen Replikaten, je 3 techn. Replikate pro Zelllinie Kontrolle (CTR) enthielt DMSO [7%]. .....	65

<b>Abbildung 24:</b> Konzentration Pazopanib [ $\mu\text{M}$ ] (y-Achse) mit korrespondierender Zellviabilität [%] (x-Achse) von 786-O <sup>WT</sup> (2 biologische Replikate, WT 1 und 2) und zugehörige polynomische Trendlinie (Poly. (WT 1 und 2)) Polynomische Trendlinien generiert durch Microsoft® Excel®, Mittelwerte aus je 3 techn. Replikaten pro Zelllinie.....	66
<b>Abbildung 25:</b> Konzentration Pazopanib [ $\mu\text{M}$ ] (y-Achse) mit korrespondierender Zellviabilität [%] (x-Achse) von 786-O <sup>PR</sup> (2 biologische Replikate, Paz 1 und 2) und zugehörige polynomische Trendlinie (Poly. (Paz 1 und 2)) Polynomische Trendlinien generiert durch Microsoft® Excel®, Mittelwerte aus je 3 techn. Replikaten pro Zelllinie.....	66
<b>Abbildung 26:</b> Berechnete IC50 [ $\mu\text{M}$ ] (y-Achse) der Zelllinien 786-O <sup>WT</sup> (blau) und 786-O <sup>PR</sup> (rot) (x-Achse) (Experiment 1) Mittelwerte aus 2 unabhängigen biologischen Replikaten, jeweils 3 technische Replikate pro Zelllinie.....	67
<b>Abbildung 27:</b> Konzentration Pazopanib [ $\mu\text{M}$ ] (y-Achse) mit korrespondierender Zellviabilität [%] (x-Achse) von 786-O <sup>WT</sup> (2 biologische Replikate, WT 1 und 2) und zugehörige polynomische Trendlinie (Poly. (WT 1 und 2)) Polynomische Trendlinien generiert durch Microsoft® Excel®, Mittelwerte aus je 3 techn. Replikaten pro Zelllinie.....	67
<b>Abbildung 28:</b> Konzentration Pazopanib [ $\mu\text{M}$ ] (y-Achse) mit korrespondierender Zellviabilität [%] (x-Achse) von 786-O <sup>PR</sup> (2 biologische Replikate, Paz 1 und 2) und zugehörige polynomische Trendlinie (Poly. (Paz 1 und 2)) Polynomische Trendlinien generiert durch Microsoft® Excel®, Mittelwerte aus je 3 techn. Replikaten pro Zelllinie.....	68
<b>Abbildung 29:</b> Berechnete IC50 [ $\mu\text{M}$ ] (y-Achse) der Zelllinien 786-O <sup>WT</sup> (blau) und 786-O <sup>PR</sup> (rot) (x-Achse) (Experiment 3) Mittelwerte aus 2 unabhängigen biologischen Replikaten, jeweils 3 technische Replikate pro Zelllinie.....	69
<b>Abbildung 30:</b> Konzentration Pazopanib [ $\mu\text{M}$ ] (y-Achse) mit korrespondierender Zellviabilität [%] (x-Achse) von 786-O <sup>WT</sup> (blau) und 786-O <sup>PR</sup> (rot) (Kombinierte Ergebnisse Experiment 1 – 3, n = 3) und zugehörige polynomische Trendlinien (Poly. (WT 1 und 2), Poly (Paz 1 und 2)) Polynomische Trendlinien generiert durch Microsoft® Excel®, Mittelwerte aus je 3 techn. Replikaten pro Zelllinie.....	70
<b>Abbildung 31:</b> Berechnete IC50 [ $\mu\text{M}$ ] (y-Achse) der Zelllinien 786-O <sup>WT</sup> (blau) und 786-O <sup>PR</sup> (rot) (x-Achse) (Kombinierte Ergebnisse Experiment 1 – 3, n = 3) Mittelwerte aus 6 unabhängigen biologischen Replikaten pro Zelllinie, je 3 techn. Replikate pro Zelllinie.....	70
<b>Abbildung 32:</b> % Zellviabilität der Zelllinien 786-O <sup>WT</sup> (blau) und 786-O <sup>PR</sup> (rot) in Prozent (y-Achse) nach 72-stündiger Behandlung mit Pazopanib [14 $\mu\text{M}$ ] (x-Achse) (Zusammenfassung Experiment 1-3) Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (n = 3), pro Experiment zwei biologische Replikate mit jeweils drei technischen Replikaten pro Zelllinie Kontrolle (CTR) enthielt DMSO [7%].....	71
<b>Abbildung 33:</b> NTA-Messung der Exosomenkonzentration pro ml, Ergebnisse einer einzelnen Messung (n = 1) Exosomen von 786-O <sup>WT</sup> : Verdünnung 1:500 (links), Verdünnung 1:100 (rechts) Konzentration der Partikel pro Milliliter (y-Achse) abhängig von der Partikelgröße in Nanometer (x-Achse) Peak des Graphen zeigt die Partikelgröße, deren Konzentration am höchsten (am häufigsten vorhanden) ist. ....	72

<b>Abbildung 34:</b> NTA-Messung der Exosomenkonzentration pro ml, Ergebnisse einer einzelnen Messung (n = 1) Exosomen von 786-O <sup>PR</sup> : Verdünnung 1:500 (links), Verdünnung 1:100 (rechts) Konzentration der Partikel pro Milliliter (y-Achse) abhängig von der Partikelgröße in Nanometer (x-Achse) Peak des Graphen zeigt die Partikelgröße, deren Konzentration am höchsten (am häufigsten vorhanden) ist. ....	73
<b>Abbildung 35:</b> Immunoblots von 786-O <sup>WT</sup> -Exosomen/786-O <sup>WT</sup> -Zelllysate (WCL) und 786-O <sup>PR</sup> -Exosomen/786-O <sup>PR</sup> -Zelllysate (WCL) aus einem unabhängigen Experiment (n = 1) .....	75
<b>Abbildung 36:</b> Nachweis der Aufnahme von Exosomen resistenter 786-O-Zellen in sensitive Zellen Negativkontrolle 786-O <sup>WT</sup> -Zellen (grün, F-Aktin) wurden für 24 Stunden mit PBS inkubiert. Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Bilder aufgenommen mit Laserscanning Mikroskop LSM 780 (Carl Zeiss AG).....	76
<b>Abbildung 37:</b> Nachweis der Aufnahme von Exosomen resistenter 786-O-Zellen in sensitive Zellen 786-O <sup>WT</sup> -Zellen (grün, F-Aktin) wurden für 24 Stunden mit Exosomen von 786-O <sup>PR</sup> (gelb) inkubiert. Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Bilder aufgenommen mit Laserscanning Mikroskop LSM 780 (Carl Zeiss AG) .....	76
<b>Abbildung 38:</b> Zellviabilität [%] (y-Achse) von 786-O <sup>WT</sup> -Zellen nach Stimulation mit PBS (grün)/Exosomen von 786-O <sup>WT</sup> (blau) bzw. 786-O <sup>PR</sup> (rot) in den Konzentrationen 8 µg/ml und 20 µg/ml (x-Achse), anschließend Kultivierung mit DMSO-haltigem Zellkulturmedium (Kontrolle) Mittelwerte ±SD berechnet aus den Ergebnissen von 2 unabhängigen Experimenten (n = 2) Zellviabilität der PBS-CTR wurde auf 100% normiert, die anderen Werte jeweils in Bezug zur CTR gesetzt Berechnung der p-Werte durch One-Way-ANOVA unter Verwendung des Tukey post-hoc-Tests # p < 0,05, ## p < 0,01, ### p < 0,001 .....	77
<b>Abbildung 39:</b> Zellviabilität [%] (y-Achse) von 786-O <sup>WT</sup> -Zellen nach Stimulation mit PBS (grün)/Exosomen von 786-O <sup>WT</sup> (blau) bzw. 786-O <sup>PR</sup> (rot) in den Konzentrationen 8 µg/ml und 20 µg/ml (x-Achse), anschließend Behandlung mit Pazopanib [14 µM] für 72 Stunden Mittelwerte ±SD berechnet aus den Ergebnissen von 2 unabhängigen Experimenten (n = 2) Zellviabilität der PBS-CTR (DMSO) wurde auf 100% normiert, die anderen Werte jeweils in Bezug zur CTR gesetzt .....	78
<b>Abbildung 40:</b> Zellviabilität [%] (y-Achse) von 786-O <sup>WT</sup> -Zellen nach Stimulation mit PBS (grün)/Exosomen von 786-O <sup>WT</sup> (blau) bzw. 786-O <sup>PR</sup> (rot) in den Konzentrationen 8 µg/ml und 20 µg/ml (x-Achse), anschließend Kultivierung mit DMSO-haltigem Zellkulturmedium (Kontrollgruppe, monochrome Säulen) oder Behandlung mit Pazopanib [14 µM] (schraffierte Säulen) für 72 Stunden Mittelwerte ±SD berechnet aus den Ergebnissen von zwei unabhängigen Experimenten (n = 2) Berechnung der p-Werte erfolgte durch One-Way-ANOVA unter Verwendung des Tukey post-hoc-Tests * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 .....	79
<b>Abbildung 41:</b> Zellviabilität [%] (y-Achse) von 786-O <sup>WT</sup> -Zellen nach Stimulation mit PBS (grün)/Exosomen von 786-O <sup>WT</sup> (blau) bzw. 786-O <sup>PR</sup> (rot) in den Konzentrationen 8 µg/ml und 20 µg/ml (x-Achse), anschließend Kultivierung mit DMSO-haltigem Zellkulturmedium (Kontrollgruppe, monochrome Säulen) oder Behandlung mit Pazopanib [14 µM] (schraffierte Säulen) für 72 Stunden Mittelwerte ±SD berechnet aus den Ergebnissen eines unabhängigen	

Experiments (n = 1) Berechnung der p-Werte erfolgte durch One-Way-ANOVA unter Verwendung des Tukey post-hoc-Tests \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 ..... 80

**Abbildung 42:** Zellviabilität [%] von 786-O<sup>WT</sup>-Zellen nach Stimulation mit PBS (grün)/Exosomen von 786-O<sup>PR</sup> (rot) in den Konzentrationen 8 µg/ml und 20 µg/ml (x-Achse), anschließend Kultivierung mit DMSO-haltigem Zellkulturmedium (Kontrollgruppe, monochrome Säulen) oder Behandlung mit Pazopanib [14 µM] (schraffierte Säulen) für 72 Stunden Mittelwerte ±SD berechnet aus den Ergebnissen von drei unabhängigen Experimenten Berechnung der p-Werte erfolgte durch One-Way-ANOVA unter Verwendung des Tukey post-hoc-Tests \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 (Effekte von Pazopanib) # p < 0,05, ## p < 0,01, ### p < 0,001 (Effekte der Exosomen)..... 81

## 9. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> WHO-Klassifikation der Nierentumoren modifiziert nach [122].....	10
<b>Tabelle 2:</b> TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinoms 2017 nach [10] .....	11
<b>Tabelle 3:</b> Stadieneinteilung nach Union for International Cancer Control (UICC) 2017 (8.Version) nach [10].....	12
<b>Tabelle 4:</b> Grading nach International Society of Urothology (ISUP) modifiziert nach [123] .....	13
<b>Tabelle 5:</b> Mögliche Symptome eines paraneoplastischen Syndroms beim Nierenzellkarzinom modifiziert nach [132] .....	13
<b>Tabelle 6:</b> Postoperative Nomogramme zur Risikobeurteilung bei Patienten mit Nierenzellkarzinom modifiziert nach [104] .....	15
<b>Tabelle 7:</b> Therapieempfehlung bei Nierenzellkarzinom entsprechend des Tumorstadiums modifiziert nach [104].....	16
<b>Tabelle 8:</b> Zugelassene Medikamentenklassen für die Therapie des Nierenzellkarzinoms (Übersicht) .....	18
<b>Tabelle 9:</b> Evaluation des individuellen Risikoprofils anhand der Motzer-Kriterien (MSKCC-Score) modifiziert nach [77,104,124] .....	23
<b>Tabelle 10:</b> Systemtherapieoptionen gemäß Risikoprofil in der Erstlinientherapie des Nierenzellkarzinoms modifiziert nach [103].....	24
<b>Tabelle 11:</b> Systemtherapieoptionen gemäß Vortherapie in der Zweitlinientherapie des Nierenzellkarzinoms modifiziert nach [104].....	24
<b>Tabelle 12:</b> Verwendete Volumina je nach Wachstumsfläche .....	42
<b>Tabelle 13:</b> Verwendete Volumina für Medium/Pazopanib Stock 1 je nach Wachstumsfläche .....	43
<b>Tabelle 14:</b> Verwendete Pazopanib-Konzentrationen und deren Zusammensetzung .....	45
<b>Tabelle 15:</b> Verwendete Antikörper .....	53
<b>Tabelle 16:</b> Stimulation mit Exosomen .....	58
<b>Tabelle 17:</b> Fixierung der Zellen und Phalloidin-Färbung .....	58
<b>Tabelle 18:</b> Einstellungen und Farblegende.....	59
<b>Tabelle 19:</b> Verwendete Zellzahlen für sämtliche Methoden/Experimente.....	60
<b>Tabelle 20:</b> Annäherungsgleichung und Bestimmtheitsmaß für polynomische Trendlinien (Experiment 1).....	66
<b>Tabelle 21:</b> Annäherungsgleichung und Bestimmtheitsmaß für polynomische Trendlinien (Experiment 3).....	68
<b>Tabelle 22:</b> Berechnete IC50 [µM] von 786-O <sup>WT</sup> und 786-O <sup>PR</sup> (Experiment 1 und 3).....	69
<b>Tabelle 23:</b> Annäherungsgleichung und Bestimmtheitsmaß für polynomische Trendlinien (Kombinierte Ergebnisse aus Experimenten 1-3, Polynomische Trendlinien generiert durch Microsoft® Excel®) .....	70
<b>Tabelle 24:</b> Messergebnisse der NTA, Exosomen von 786-O <sup>WT</sup> und 786-O <sup>PR</sup> Ergebnisse einer einzelnen Messung (n = 1).....	73
<b>Tabelle 25:</b> Gemessene Partikel/ml, Exosomen von 786-O <sup>WT</sup> und 786-O <sup>PR</sup> Ergebnisse einer einzelnen Messung (n = 1) .....	74
<b>Tabelle 26:</b> Partikel/Zelle von 786-O <sup>WT</sup> und 786-O <sup>PR</sup> .....	74

## 10. Literaturverzeichnis

1. Abbaspour Babaei M, Kamalidehghan B, Saleem M, Huri HZ, Ahmadipour F (2016) Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells. *Drug Des Devel Ther* 10:2443–2459
2. Abels ER, Breakefield XO (2016) Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and Molecular Neurobiology* 36:301–312
3. Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC (2013) Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of Neuro-Oncology* 113:1–11
4. ALANEE S, CLEMONS J, ZAHND W, SADOWSKI D, DYND A D (2015) Trichloroethylene Is Associated with Kidney Cancer Mortality: A Population-based Analysis. *Anticancer Res* 35:4009
5. Amato RJ (2000) Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 27:177–186
6. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C (2008) Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 22:1276–1312
7. Asati V, Mahapatra DK, Bharti SK (2016) PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 109:314–341
8. Asimakopoulos AD, Miano R, Annino F, Micali S, Spera E, Iorio B, Vespasiani G, Gaston R (2014) Robotic radical nephrectomy for renal cell carcinoma: a systematic review. *BMC Urol* 14:75–75
9. Azam F, Mehta S, Harris AL (2010) Mechanisms of resistance to antiangiogenesis therapy. *European Journal of Cancer* 46:1323–1332
10. B. Ljungberg, L. Albiges, J. Bedke, A. Bex, U. Capitanio, R.H. Giles, M. Hora, T. Klatter, T. Lam, L. Marconi, T. Powles, A. Volpe (2018) Guidelines on renal cell carcinoma. European Association of Urology (EAU): Arnhem, The Netherlands URL: <https://uroweb.org/guideline/renal-cell-carcinoma/#1>
11. Bach D-H, Hong J-Y, Park HJ, Lee SK (2017) The role of exosomes and miRNAs in drug-resistance of cancer cells. *Int J Cancer* 141:220–230
12. Banks RE, Tirukonda P, Taylor C, Hornigold N, Astuti D, Cohen D, Maher ER, Stanley AJ, Harnden P, Joyce A, Knowles M, Selby PJ (2006) Genetic and Epigenetic Analysis of von Hippel-Lindau (VHL) Gene Alterations and Relationship with Clinical Variables in Sporadic Renal Cancer. *Cancer Research* 66:2000–2011
13. Baumgart SC (2017) Die Bedeutung exosomaler RNAs für das muskelinvasive Harnblasenkarzinom.

14. Bellingham SA, Coleman BM, Hill AF (2012) Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res* 40:10937–10949
15. Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D (2003) Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 111:1287–1295
16. Bergers G, Hanahan D (2008) Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 8:592–603
17. Bergström A, Hsieh CC, Lindblad P, Lu CM, Cook NR, Wolk A (2001) Obesity and renal cell cancer--a quantitative review. *Br J Cancer* 85:984–990
18. Bonsergent E, Grisard E, Buchrieser J, Schwartz O, Théry C, Lavieu G (2021) Quantitative characterization of extracellular vesicle uptake and content delivery within mammalian cells. *Nat Commun* 12:1864
19. Bridges EM, Harris AL (2011) The angiogenic process as a therapeutic target in cancer. *Biochemical Pharmacology* 81:1183–1191
20. 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
21. Busatto S, Giacomini A, Montis C, Ronca R, Bergese P (2018) Uptake Profiles of Human Serum Exosomes by Murine and Human Tumor Cells through Combined Use of Colloidal Nanoplasmonics and Flow Cytofluorimetric Analysis. *Anal Chem* 90:7855–7861
22. Buti S, Bersanelli M, Sikokis A, Maines F, Facchinetti F, Bria E, Ardizzoni A, Tortora G, Massari F (2013) Chemotherapy in metastatic renal cell carcinoma today? A systematic review. *Anti-Cancer Drugs* 24:
23. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ (2007) Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 27:111–122
24. Caldwell MC, Hough C, Fürer S, Linehan WM, Morin PJ, Gorospe M (2002) Serial analysis of gene expression in renal carcinoma cells reveals VHL-dependent sensitivity to TNF $\alpha$  cytotoxicity. *Oncogene* 21:929–936
25. Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D (2005) Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 8:299–309
26. Chellappan DK, Chellian J, Ng ZY, Sim YJ, Theng CW, Ling J, Wong M, Foo JH, Yang GJ, Hang LY, Nathan S, Singh Y, Gupta G (2017) The role of pazopanib on tumour angiogenesis and in the management of cancers: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 96:768–781

27. Chen G, Huang AC, Zhang W, Zhang G, Wu M, Xu W, Yu Z, Yang J, Wang B, Sun H, Xia H, Man Q, Zhong W, Antelo LF, Wu B, Xiong X, Liu X, Guan L, Li T, Liu S, Yang R, Lu Y, Dong L, McGettigan S, Somasundaram R, Radhakrishnan R, Mills G, Lu Y, Kim J, Chen YH, Dong H, Zhao Y, Karakousis GC, Mitchell TC, Schuchter LM, Herlyn M, Wherry EJ, Xu X, Guo W (2018) Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature* 560:382–386
28. Chen W, Liu X, Lv M, Chen L, Zhao J, Zhong S, Ji M, Hu Q, Luo Z, Wu J, Tang J (2014) Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of microRNAs. *PLoS One* 9:e95240
29. Choi J, Chen J, Schreiber SL, Clardy J (1996) Structure of the FKBP12-Rapamycin Complex Interacting with Binding Domain of Human FRAP. *Science* 273:239–242
30. Choueiri TK, Motzer RJ (2017) Systemic Therapy for Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 376:354–366
31. Christensson A, Savage C, Sjoberg DD, Cronin AM, O'Brien MF, Lowrance W, Nilsson PM, Vickers AJ, Russo P, Lilja H (2013) Association of cancer with moderately impaired renal function at baseline in a large, representative, population-based cohort followed for up to 30 years. *Int J Cancer* 133:1452–1458
32. Cindolo L, de la Taille A, Messina G, Romis L, Abbou CC, Altieri V, Rodriguez A, Patard JJ (2003) A preoperative clinical prognostic model for non-metastatic renal cell carcinoma. *BJU Int* 92:901–905
33. Clevert D-A, Sterzik A, Braunagel M, Notohamiprodjo M, Graser A (2013) Moderne Bildgebung von Nierentumoren. *Der Urologe* 52:515–526
34. Conner SD, Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422:37–44
35. Corrado C, Raimondo S, Chiesi A, Ciccia F, De Leo G, Alessandro R (2013) Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: basic science and clinical applications. *Int J Mol Sci* 14:5338–5366
36. Coulson E, Zhou S, Akin C (2019) The Role of KIT Mutations in Anaphylaxis. *Current Allergy and Asthma Reports* 19:31
37. Cumberbatch MG, Rota M, Catto JWF, La Vecchia C (2016) The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis: A Comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks. *European Urology* 70:458–466
38. Dabestani S, Marconi L, Hofmann F, Stewart F, Lam TBL, Canfield SE, Staehler M, Powles T, Ljungberg B, Bex A (2014) Local treatments for metastases of renal cell carcinoma: a systematic review. *Lancet Oncol* 15:e549-561
39. Dabestani S, Marconi L, Bex A (2016) Metastasis therapies for renal cancer. *Curr Opin Urol* 26:566–572

40. Doherty GJ, McMahon HT (2009) Mechanisms of Endocytosis. *Annu Rev Biochem* 78:857–902
41. Doyle L, Wang M (2019) Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells* 8:727
42. Eitan E, Zhang S, Witwer KW, Mattson MP (2015) Extracellular vesicle–depleted fetal bovine and human sera have reduced capacity to support cell growth. *PLoS One* 10:e0126373
43. Feng D, Zhao W-L, Ye Y-Y, Bai X-C, Liu R-Q, Chang L-F, Zhou Q, Sui S-F (2010) Cellular Internalization of Exosomes Occurs Through Phagocytosis. *Traffic* 11:675–687
44. Ferguson SW, Nguyen J (2016) Exosomes as therapeutics: The implications of molecular composition and exosomal heterogeneity. *Journal of Controlled Release* 228:179–190
45. Filipe V, Hawe A, Jiskoot W (2010) Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. *Pharmaceutical Research* 27:796–810
46. Flaherty KT, Fuchs CS, Colditz GA, Stampfer MJ, Speizer FE, Willett WC, Curhan GC (2005) A Prospective Study of Body Mass Index, Hypertension, and Smoking and the Risk of Renal Cell Carcinoma (United States). *Cancer Causes & Control* 16:1099–1106
47. Fong JT, Jacobs RJ, Moravec DN, Uppada SB, Botting GM, Nlend M, Puri N (2013) Alternative signaling pathways as potential therapeutic targets for overcoming EGFR and c-Met inhibitor resistance in non-small cell lung cancer. *PLoS One* 8:e78398
48. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, Sharpe AH (2009) PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med* 206:3015–3029
49. Franzen CA, Simms PE, Van Huis AF, Foreman KE, Kuo PC, Gupta GN (2014) Characterization of Uptake and Internalization of Exosomes by Bladder Cancer Cells. *BioMed Research International* 2014:1–11
50. Freddie Bray BSc, MSc, PhD, Jacques Ferlay ME, Isabelle Soerjomataram MD, MSc, PhD, Rebecca L. Siegel MPH, Lindsey A. Torre MSPH, Ahmedin Jemal PhD, DVM (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
51. Fyfe G, Fisher RI, Rosenberg SA, Sznol M, Parkinson DR, Louie AC (1995) Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *JCO* 13:688–696
52. Gagliano T, Gentilin E, Tagliati F, Benfini K, Di Pasquale C, Feo C, Falletta S, Riva E, degli Uberti E, Zatelli MC (2015) Inhibition of epithelial growth factor receptor can play an important role in reducing cell growth and survival in adrenocortical tumors. *Biochemical Pharmacology* 98:639–648

53. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister, Zentrum für Krebsregisterdaten (2021) Krebs in Deutschland für 2017/2018. Robert-Koch-Institut, Berlin
54. Gibney GT, Aziz SA, Camp RL, Conrad P, Schwartz BE, Chen CR, Kelly WK, Kluger HM (2013) c-Met is a prognostic marker and potential therapeutic target in clear cell renal cell carcinoma. *Ann Oncol* 24:343–349
55. Glebov OO, Bright NA, Nichols BJ (2006) Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nature Cell Biology* 8:46–54
56. Gnarr JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, Latif F, Liu S, Chen F, Duh F-M, Lubensky I, Duan DR, Florence C, Pozzatti R, Walther MM, Bander NH, Grossman HB, Brauch H, Pomer S, Brooks JD, Isaacs WB, Lerman MI, Zbar B, Linehan WM (1994) Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nature Genetics* 7:85–90
57. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C (2004) Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization. *N Engl J Med* 351:1296–1305
58. Gotink KJ, Verheul HMW (2010) Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? *Angiogenesis* 13:1–14
59. Gotink KJ, Broxterman HJ, Labots M, de Haas RR, Dekker H, Honeywell RJ, Rudek MA, Beerepoot LV, Musters RJ, Jansen G, Griffioen AW, Assaraf YG, Pili R, Peters GJ, Verheul HMW (2011) Lysosomal sequestration of sunitinib: a novel mechanism of drug resistance. *Clin Cancer Res* 17:7337–7346
60. Gotink KJ, Rovithi M, de Haas RR, Honeywell RJ, Dekker H, Poel D, Azijli K, Peters GJ, Broxterman HJ, Verheul HMW (2015) Cross-resistance to clinically used tyrosine kinase inhibitors sunitinib, sorafenib and pazopanib. *Cell Oncol (Dordr)* 38:119–129
61. Goto K, Oue N, Shinmei S, Sentani K, Sakamoto N, Naito Y, Hayashi T, Teishima J, Matsubara A, Yasui W (2013) Expression of miR-486 is a potential prognostic factor after nephrectomy in advanced renal cell carcinoma. *Mol Clin Oncol* 1:235–240
62. Gray RE, Harris GT (2019) Renal Cell Carcinoma: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician* 99:179–184
63. Gudbergsson JM, Johnsen KB, Skov MN, Duroux M (2016) Systematic review of factors influencing extracellular vesicle yield from cell cultures. *Cytotechnology* 68:579–592
64. Guescini M, Genedani S, Stocchi V, Agnati LF (2009) Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *Journal of Neural Transmission* 117:1
65. Gustafsson A, Martuszevska D, Johansson M, Ekman C, Hafizi S, Ljungberg B, Dahlbäck B (2009) Differential Expression of Axl and Gas6 in Renal Cell Carcinoma Reflecting Tumor Advancement and Survival. *Clinical Cancer Research* 15:4742–4749

66. Haliloglu AH, Gulpinar O, Ozden E, Beduk Y (2011) Urinary ultrasonography in screening incidental renal cell carcinoma: is it obligatory? *International Urology and Nephrology* 43:687–690
67. Hall A, Nobes CD (2000) Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355:965–970
68. Hallscheidt P (2019) Bildgebung bei Nierenzellkarzinom. *Der Onkologe* 25:489–496
69. Hay N, Sonenberg N (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18:1926–1945
70. Hayes O, Ramos B, Rodríguez LL, Aguilar A, Badía T, Castro FO (2005) Cell confluency is as efficient as serum starvation for inducing arrest in the G0/G1 phase of the cell cycle in granulosa and fibroblast cells of cattle. *Animal Reproduction Science* 87:181–192
71. He J, He J, Min L, He Y, Guan H, Wang J, Peng X (2020) Extracellular vesicles transmitted miR-31-5p promotes sorafenib resistance by targeting MLH1 in renal cell carcinoma. *International Journal of Cancer* 146:1052–1063
72. Heinzelmann J, Henning B, Sanjmyatav J, Posorski N, Steiner T, Wunderlich H, Gajda MR, Junker K (2011) Specific miRNA signatures are associated with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *World Journal of Urology* 29:367–373
73. Heinzelmann J, Arndt M, Pleyers R, Fehlmann T, Hoelters S, Zeuschner P, Vogt A, Pryalukhin A, Schaeffeler E, Bohle RM, Gajda M, Janssen M, Stoeckle M, Junker K (2019) 4-miRNA Score Predicts the Individual Metastatic Risk of Renal Cell Carcinoma Patients. *Annals of Surgical Oncology* 26:3765–3773
74. Heldin C-H, Westermark B (1999) Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor. *Physiological Reviews* 79:1283–1316
75. Heldwein FL, Escudier B, Smyth G, Souto CAV, Vallancien G (2009) Metastatic renal cell carcinoma management. *Int Braz J Urol* 35:256–270
76. 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
77. Heng DYC, Xie W, Regan MM, Harshman LC, Bjarnason GA, Vaishampayan UN, Mackenzie M, Wood L, Donskov F, Tan M-H, Rha S-Y, Agarwal N, Kollmannsberger C, Rini BI, Choueiri TK (2013) External validation and comparison with other models of the International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium prognostic model: a population-based study. *Lancet Oncol* 14:141–148
78. Hicklin DJ, Ellis LM (2005) Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. *JCO* 23:1011–1027

79. Himbert D, Zeuschner P, Ayoubian H, Heinzelmann 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 (Basel)* 10:1034
80. Hisakane K, Seike M, Sugano T, Yoshikawa A, Matsuda K, Takano N, Takahashi S, Noro R, Gemma A (2021) Exosome-derived miR-210 involved in resistance to osimertinib and epithelial-mesenchymal transition in EGFR mutant non-small cell lung cancer cells. *Thoracic Cancer* 12:1690–1698
81. Horibe S, Tanahashi T, Kawauchi S, Murakami Y, Rikitake Y (2018) Mechanism of recipient cell-dependent differences in exosome uptake. *BMC Cancer* 18:47
82. Hrdinova T, Toman O, Dresler J, Klimentova J, Salovska B, Pajer P, Bartos O, Polivkova V, Linhartova J, Machova Polakova K, Kabickova H, Brodska B, Krijt M, Zivny J, Vyoral D, Petrak J (2021) Exosomes released by imatinib-resistant K562 cells contain specific membrane markers, IFITM3, CD146 and CD36 and increase the survival of imatinib-sensitive cells in the presence of imatinib. *Int J Oncol* 58:238–250
83. Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger M, Heng DY, Larkin J, Ficarra V (2017) Renal cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 3:17009–17009
84. Huang WC, Levey AS, Serio AM, Snyder M, Vickers AJ, Raj GV, Scardino PT, Russo P (2006) Chronic kidney disease after nephrectomy in patients with renal cortical tumours: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol* 7:735–740
85. Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ, Abraham RT (2002) Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol* 22:7004–7014
86. Jamis-Dow CA, Choyke PL, Jennings SB, Linehan WM, Thakore KN, Walther MM (1996) Small (< or = 3-cm) renal masses: detection with CT versus US and pathologic correlation. *Radiology* 198:785–788
87. Jay D Hunt, Olga L van der Hel, Garnett P McMillan, Paolo Boffetta, Paul Brennan (2005) Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking : meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer* 101–108
88. Jayson M, Sanders H (1998) Increased incidence of serendipitously discovered renal cell carcinoma. *Urology* 51:203–205
89. Junker K, Heinzelmann J, Beckham C, Ochiya T, Jenster G (2016) Extracellular Vesicles and Their Role in Urologic Malignancies. *European Urology* 70:323–331
90. Jurgielewicz BJ, Yao Y, Stice SL (2020) Kinetics and Specificity of HEK293T Extracellular Vesicle Uptake using Imaging Flow Cytometry. *Nanoscale Research Letters* 15:170
91. Kaelin WG (2007) von Hippel-Lindau Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2:145–173

92. Kalluri R, LeBleu VS (2020) The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* 367:eaau6977
93. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2008) PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu Rev Immunol* 26:677–704
94. Kirchhausen T (2000) Clathrin. *Annu Rev Biochem* 69:699–727
95. Kirchner GI, Meier-Wiedenbach I, Manns MP (2004) Clinical Pharmacokinetics of Everolimus. *Clinical Pharmacokinetics* 43:83–95
96. Komi DEA, Rambasek T, Wöhrl S (2018) Mastocytosis: from a Molecular Point of View. *Clin Rev Allergy Immunol* 54:397–411
97. Kwok G, Yau TCC, Chiu JW, Tse E, Kwong Y-L (2016) Pembrolizumab (Keytruda). *Hum Vaccin Immunother* 12:2777–2789
98. Kwok H-H, Ning Z, Chong PW-C, Wan TS-K, Ng MH-L, Ho GYF, Ip MS-M, Lam DC-L (2019) Transfer of Extracellular Vesicle-Associated-RNAs Induces Drug Resistance in ALK-Translocated Lung Adenocarcinoma. *Cancers (Basel)* 11:E104
99. Laplante M, Sabatini DM (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149:274–293
100. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K, International Agency for Research on Cancer Handbook Working Group (2016) Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med* 375:794–798
101. Leach DR, Krummel MF, Allison JP (1996) Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271:1734–1736
102. Lee CT, Katz J, Fearn PA, Russo P (2002) Mode of presentation of renal cell carcinoma provides prognostic information. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 7:135–140
103. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) (2023) S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms. URL: [https://register.awmf.org/assets/guidelines/043-017OLI\\_S3\\_Diagnostik-Therapie-Nachsorge-Nierenzellkarzinom\\_2023-02.pdf](https://register.awmf.org/assets/guidelines/043-017OLI_S3_Diagnostik-Therapie-Nachsorge-Nierenzellkarzinom_2023-02.pdf)
104. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 3.0, 2021. URL: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/nierenzellkarzinom/>
105. Li B, Chan HL, Chen P (2019) Immune Checkpoint Inhibitors: Basics and Challenges. *CMC* 26:3009–3025
106. Linger RMA, Keating AK, Earp HS, Graham DK (2008) TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv Cancer Res* 100:35–83

107. Linger RMA, Keating AK, Earp HS, Graham DK (2010) Taking aim at Mer and Axl receptor tyrosine kinases as novel therapeutic targets in solid tumors. *Expert Opin Ther Targets* 14:1073–1090
108. Liu J, Ren L, Li S, Li W, Zheng X, Yang Y, Fu W, Yi J, Wang J, Du G (2021) The biology, function, and applications of exosomes in cancer. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 11:2783–2797
109. Liu X, Jiang T, Li X, Zhao C, Li J, Zhou F, Zhang L, Zhao S, Jia Y, Shi J, Gao G, Li W, Zhao J, Chen X, Su C, Ren S, Zhou C (2020) Exosomes transmit T790M mutation-induced resistance in EGFR-mutant NSCLC by activating PI3K/AKT signalling pathway. *J Cell Mol Med* 24:1529–1540
110. Llorente A, Skotland T, Sylvänne T, Kauhanen D, Róg T, Orłowski A, Vattulainen I, Ekroos K, Sandvig K (2013) Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1831:1302–1309
111. Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, Gho YS, Kurochkin IV, Mathivanan S, Quesenberry P, Sahoo S, Tahara H, Wauben MH, Witwer KW, Théry C (2014) Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles* 3:26913
112. Lowrance WT, Thompson RH, Yee DS, Kaag M, Donat SM, Russo P (2010) Obesity is associated with a higher risk of clear-cell renal cell carcinoma than with other histologies. *BJU Int* 105:16–20
113. Lowrance WT, Ordoñez J, Udaltsova N, Russo P, Go AS (2014) CKD and the risk of incident cancer. *J Am Soc Nephrol* 25:2327–2334
114. Lv M, Zhu X, Chen W, Zhong S, Hu Q, Ma T, Zhang J, Chen L, Tang J, Zhao J (2014) Exosomes mediate drug resistance transfer in MCF-7 breast cancer cells and a probable mechanism is delivery of P-glycoprotein. *Tumor Biology* 35:10773–10779
115. Macleod LC, Hotaling JM, Wright JL, Davenport MT, Gore JL, Harper J, White E (2013) Risk factors for renal cell carcinoma in the VITAL study. *J Urol* 190:1657–1661
116. Makhov P, Joshi S, Ghatalia P, Kutikov A, Uzzo RG, Kolenko VM (2018) Resistance to Systemic Therapies in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Mechanisms and Management Strategies. *Mol Cancer Ther* 17:1355–1364
117. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ (2010) Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics* 73:1907–1920
118. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EWT, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA (2007) Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1773:1263–1284

119. McKiernan J, Simmons R, Katz J, Russo P (2002) Natural history of chronic renal insufficiency after partial and radical nephrectomy. *Urology* 59:816–820
120. Meric-Bernstam F, Gonzalez-Angulo AM (2009) Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *J Clin Oncol* 27:2278–2287
121. Mevorach RA, Segal AJ, Tersegho ME, Frank IN (1992) Renal cell carcinoma: incidental diagnosis and natural history: review of 235 cases. *Urology* 39:519–522
122. Moch H (2016) WHO-Klassifikation von 2016 und erste S3-Leitlinie zum Nierenzellkarzinom. *Der Pathologe* 37:127–133
123. Moch H (2016) WHO-ISUP-Graduierungssystem für Nierenkarzinome. *Der Pathologe* 37:355–360
124. Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J (1999) Survival and Prognostic Stratification of 670 Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma. *JCO* 17:2530–2530
125. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Pili R, Bjarnason GA, Garcia-del-Muro X, Sosman JA, Solska E, Wilding G, Thompson JA, Kim ST, Chen I, Huang X, Figlin RA (2009) Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 27:3584–3590
126. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF (2014) Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *null* 3:24641
127. Navai N, Wood CG (2012) Environmental and modifiable risk factors in renal cell carcinoma. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 30:220–224
128. Nickerson ML, Jaeger E, Shi Y, Durocher JA, Mahurkar S, Zaridze D, Matveev V, Janout V, Kollarova H, Bencko V, Navratilova M, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Mukeria A, Holcatova I, Schmidt LS, Toro JR, Karami S, Hung R, Gerard GF, Linehan WM, Merino M, Zbar B, Boffetta P, Brennan P, Rothman N, Chow W-H, Waldman FM, Moore LE (2008) Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors. *Clin Cancer Res* 14:4726–4734
129. Niu S, Ma X, Zhang Y, Liu Y-N, Chen X, Gong H, Yao Y, Liu K, Zhang X (2018) MicroRNA-19a and microRNA-19b promote the malignancy of clear cell renal cell carcinoma through targeting the tumor suppressor RhoB. *PLoS One* 13:e0192790
130. Oliveira SHP, Lukacs NW (2003) Stem cell factor: a hemopoietic cytokine with important targets in asthma. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2:313–318
131. Ornitz DM, Itoh N (2015) The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4:215–266
132. Palapattu GS, Kristo B, Rajfer J (2002) Paraneoplastic syndromes in urologic malignancy: the many faces of renal cell carcinoma. *Rev Urol* 4:163–170

133. Pantuck AJ, Seligson DB, Klatter T, Yu H, Leppert JT, Moore L, O'Toole T, Gibbons J, Beldegrun AS, Figlin RA (2007) Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma: implications for molecular patient selection for targeted therapy. *Cancer* 109:2257–2267
134. Patel PH, Chadalavada RSV, Chaganti RSK, Motzer RJ (2006) Targeting von Hippel-Lindau Pathway in Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 12:7215
135. PETERFI L, BJERCKE T, YUSENKO MV, KOVACS G, BANYAI D (2020) Cytoplasmic Expression of AXL Is Associated With High Risk of Postoperative Relapse of Conventional Renal Cell Carcinoma. *Anticancer Res* 40:3485
136. Pužar Dominkuš P, Stenovec M, Sitar S, Lasič E, Zorec R, Plemenitaš A, Žagar E, Kreft M, Lenassi M (2018) PKH26 labeling of extracellular vesicles: Characterization and cellular internalization of contaminating PKH26 nanoparticles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1860:1350–1361
137. Qin Z, Xu Q, Hu H, Yu L, Zeng S (2020) Extracellular Vesicles in Renal Cell Carcinoma: Multifaceted Roles and Potential Applications Identified by Experimental and Computational Methods. *Front Oncol* 10:724–724
138. Qiu M, Liu L, Chen L, Tan G, Liang Z, Wang K, Liu J, Chen H (2014) microRNA-183 plays as oncogenes by increasing cell proliferation, migration and invasion via targeting protein phosphatase 2A in renal cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 452:163–169
139. Qu J, Jiang M, Wang L, Zhao D, Qin K, Wang Y, Tao J, Zhang X (2020) Mechanism and potential predictive biomarkers of immune checkpoint inhibitors in NSCLC. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 127:109996
140. 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, Bao Y, Wu D-S, Miao X, Sun H-Y, Sun Y-H, Wang H-Y, 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
141. Quan J, Pan X, Li Y, Hu Y, Tao L, Li Z, Zhao L, Wang J, Li H, Lai Y, Zhou L, Lin C, Gui Y, Ye J, Zhang F, Lai Y (2019) MiR-23a-3p acts as an oncogene and potential prognostic biomarker by targeting PNR2 in RCC. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 110:656–666
142. Ricketts CJ, De Cubas AA, Fan H, Smith CC, Lang M, Reznik E, Bowlby R, Gibb EA, Akbani R, Beroukhim R, Bottaro DP, Choueiri TK, Gibbs RA, Godwin AK, Haake S, Hakimi AA, Henske EP, Hsieh JJ, Ho TH, Kanchi RS, Krishnan B, Kwiatkowski DJ, Lui W, Merino MJ, Mills GB, Myers J, Nickerson ML, Reuter VE, Schmidt LS, Shelley CS, Shen H, Shuch B, Signoretti S, Srinivasan R, Tamboli P, Thomas G, Vincent BG, Vocke CD, Wheeler DA, Yang L, Kim WY, Robertson AG, Caesar-Johnson SJ, Demchok JA, Felau I, Kasapi M, Ferguson

ML, Hutter CM, Sofia HJ, Tarnuzzer R, Wang Z, Yang L, Zenklusen JC, Zhang J (Julia), Chudamani S, Liu J, Lolla L, Naresh R, Pihl T, Sun Q, Wan Y, Wu Y, Cho J, DeFreitas T, Frazer S, Gehlenborg N, Getz G, Heiman DI, Kim J, Lawrence MS, Lin P, Meier S, Noble MS, Saksena G, Voet D, Zhang H, Bernard B, Chambwe N, Dhankani V, Knijnenburg T, Kramer R, Leinonen K, Liu Y, Miller M, Reynolds S, Shmulevich I, Thorsson V, Zhang W, Akbani R, Broom BM, Hegde AM, Ju Z, Kanchi RS, Korkut A, Li J, Liang H, Ling S, Liu W, Lu Y, Mills GB, Ng K-S, Rao A, Ryan M, Wang J, Weinstein JN, Zhang J, Abeshouse A, Armenia J, Chakravarty D, Chatila WK, de Bruijn I, Gao J, Gross BE, Heins ZJ, Kundra R, La K, Ladanyi M, Luna A, Nissan MG, Ochoa A, Phillips SM, Reznik E, Sanchez-Vega F, Sander C, Schultz N, Sheridan R, Sumer SO, Sun Y, Taylor BS, Wang J, Zhang H, Anur P, Peto M, Spellman P, Benz C, Stuart JM, Wong CK, Yau C, Hayes DN, Parker JS, Wilkerson MD, Ally A, Balasundaram M, Bowlby R, Brooks D, Carlsen R, Chuah E, Dhalla N, Holt R, Jones SJM, Kasaian K, Lee D, Ma Y, Marra MA, Mayo M, Moore RA, Mungall AJ, Mungall K, Robertson AG, Sadeghi S, Schein JE, Sipahimalani P, Tam A, Thiessen N, Tse K, Wong T, Berger AC, Beroukhir R, Cherniack AD, Cibulskis C, Gabriel SB, Gao GF, Ha G, Meyerson M, Schumacher SE, Shih J, Kucherlapati MH, Kucherlapati RS, Baylin S, Cope L, Danilova L, Bootwalla MS, Lai PH, Maglinte DT, Van Den Berg DJ, Weisenberger DJ, Auman JT, Balu S, Bodenheimer T, Fan C, Hoadley KA, Hoyle AP, Jefferys SR, Jones CD, Meng S, Mieczkowski PA, Mose LE, Perou AH, Perou CM, Roach J, Shi Y, Simons JV, Skelly T, Soloway MG, Tan D, Veluvolu U, Fan H, Hinoue T, Laird PW, Shen H, Zhou W, Bellair M, Chang K, Covington K, Creighton CJ, Dinh H, Doddapaneni H, Donehower LA, Drummond J, Gibbs RA, Glenn R, Hale W, Han Y, Hu J, Korchina V, Lee S, Lewis L, Li W, Liu X, Morgan M, Morton D, Muzny D, Santibanez J, Sheth M, Shinbrot E, Wang L, Wang M, Wheeler DA, Xi L, Zhao F, Hess J, Appelbaum EL, Bailey M, Cordes MG, Ding L, Fronick CC, Fulton LA, Fulton RS, Kandoth C, Mardis ER, McLellan MD, Miller CA, Schmidt HK, Wilson RK, Crain D, Curley E, Gardner J, Lau K, Mallery D, Morris S, Paulauskis J, Penny R, Shelton C, Shelton T, Sherman M, Thompson E, Yena P, Bowen J, Gastier-Foster JM, Gerken M, Leraas KM, Lichtenberg TM, Ramirez NC, Wise L, Zmuda E, Corcoran N, Costello T, Hovens C, Carvalho AL, de Carvalho AC, Fregnani JH, Longatto-Filho A, Reis RM, Scapulatempo-Neto C, Silveira HCS, Vidal DO, Burnette A, Eschbacher J, Hermes B, Noss A, Singh R, Anderson ML, Castro PD, Ittmann M, Huntsman D, Kohl B, Le X, Thorp R, Andry C, Duffy ER, Lyadov V, Paklina O, Setdikova G, Shabunin A, Tavobilov M, McPherson C, Warnick R, Berkowitz R, Cramer D, Feltmate C, Horowitz N, Kibel A, Muto M, Raut CP, Malykh A, Barnholtz-Sloan JS, Barrett W, Devine K, Fulop J, Ostrom QT, Shimmel K, Wolinsky Y, Sloan AE, De Rose A, Giuliante F, Goodman M, Karlan BY, Hagedorn CH, Eckman J, Harr J, Myers J, Tucker K, Zach LA, Deyarmin B, Hu H, Kvecher L, Larson C, Mural RJ, Somiari S, Vicha A, Zelinka T, Bennett J, Iacocca M, Rabeno B, Swanson P, Latour M, Lacombe L, Têtu B, Bergeron A, McGraw M, Staugaitis SM, Chabot

J, Hibshoosh H, Sepulveda A, Su T, Wang T, Potapova O, Voronina O, Desjardins L, Mariani O, Roman-Roman S, Sastre X, Stern M-H, Cheng F, Signoretti S, Berchuck A, Bigner D, Lipp E, Marks J, McCall S, McLendon R, Secord A, Sharp A, Behera M, Brat DJ, Chen A, Delman K, Force S, Khuri F, Magliocca K, Maithel S, Olson JJ, Owonikoko T, Pickens A, Ramalingam S, Shin DM, Sica G, Van Meir EG, Zhang H, Eijckenboom W, Gillis A, Korpershoek E, Looijenga L, Oosterhuis W, Stoop H, van Kessel KE, Zwarthoff EC, Calatozzolo C, Cuppini L, Cuzzubbo S, DiMeco F, Finocchiaro G, Mattei L, Perin A, Pollo B, Chen C, Houck J, Lohavanichbutr P, Hartmann A, Stoehr C, Stoehr R, Taubert H, Wach S, Wullich B, Kycler W, Murawa D, Wiznerowicz M, Chung K, Edenfield WJ, Martin J, Baudin E, Bublely G, Bueno R, De Rienzo A, Richards WG, Kalkanis S, Mikkelsen T, Noushmehr H, Scarpace L, Girard N, Aymerich M, Campo E, Giné E, Guillermo AL, Van Bang N, Hanh PT, Phu BD, Tang Y, Colman H, Evason K, Dottino PR, Martignetti JA, Gabra H, Juhl H, Akeredolu T, Stepa S, Hoon D, Ahn K, Kang KJ, Beuschlein F, Breggia A, Birrer M, Bell D, Borad M, Bryce AH, Castle E, Chandan V, Cheville J, Copland JA, Farnell M, Flotte T, Giama N, Ho T, Kendrick M, Kocher J-P, Kopp K, Moser C, Nagorney D, O'Brien D, O'Neill BP, Patel T, Petersen G, Que F, Rivera M, Roberts L, Smallridge R, Smyrk T, Stanton M, Thompson RH, Torbenson M, Yang JD, Zhang L, Brimo F, Ajani JA, Gonzalez AMA, Behrens C, Bondaruk J, Broaddus R, Czerniak B, Esmaeli B, Fujimoto J, Gershenwald J, Guo C, Lazar AJ, Logothetis C, Meric-Bernstam F, Moran C, Ramondetta L, Rice D, Sood A, Tamboli P, Thompson T, Troncoso P, Tsao A, Wistuba I, Carter C, Haydu L, Hersey P, Jakrot V, Kakavand H, Kefford R, Lee K, Long G, Mann G, Quinn M, Saw R, Scolyer R, Shannon K, Spillane A, Stretch onathan, Synott M, Thompson J, Wilmott J, Al-Ahmadie H, Chan TA, Ghossein R, Gopalan A, Levine DA, Reuter V, Singer S, Singh B, Tien NV, Broudy T, Mirsaidi C, Nair P, Drwiega P, Miller J, Smith J, Zaren H, Park J-W, Hung NP, Kebebew E, Linehan WM, Metwalli AR, Pacak K, Pinto PA, Schiffman M, Schmidt LS, Vocke CD, Wentzensen N, Worrell R, Yang H, Moncrieff M, Goparaju C, Melamed J, Pass H, Botnariuc N, Caraman I, Cernat M, Chemencedji I, Clipca A, Doruc S, Gorincioi G, Mura S, Pirtac M, Stancul I, Tcaciuc D, Albert M, Alexopoulou I, Arnaout A, Bartlett J, Engel J, Gilbert S, Parfitt J, Sekhon H, Thomas G, Rassl DM, Rintoul RC, Bifulco C, Tamakawa R, Urba W, Hayward N, Timmers H, Antenucci A, Facciolo F, Grazi G, Marino M, Merola R, de Krijger R, Gimenez-Roqueplo A-P, Piché A, Chevalier S, McKercher G, Birsoy K, Barnett G, Brewer C, Farver C, Naska T, Pennell NA, Raymond D, Schilero C, Smolenski K, Williams F, Morrison C, Borgia JA, Liptay MJ, Pool M, Seder CW, Junker K, Omberg L, Dinkin M, Manikhas G, Alvaro D, Bragazzi MC, Cardinale V, Carpino G, Gaudio E, Chesla D, Cottingham S, Dubina M, Moiseenko F, Dhanasekaran R, Becker K-F, Janssen K-P, Slotta-Huspenina J, Abdel-Rahman MH, Aziz D, Bell S, Cebulla CM, Davis A, Duell R, Elder JB, Hilty J, Kumar B, Lang J, Lehman NL, Mandt R, Nguyen P, Pilarski R, Rai K, Schoenfield L, Senecal K, Wakely P, Hansen P, Lechan R, Powers J, Tischler A, Grizzle WE, Sexton KC, Kastl A, Henderson J,

Porten S, Waldmann J, Fassnacht M, Asa SL, Schadendorf D, Couce M, Graefen M, Huland H, Sauter G, Schlomm T, Simon R, Tennstedt P, Olabode O, Nelson M, Bathe O, Carroll PR, Chan JM, Disaia P, Glenn P, Kelley RK, Landen CN, Phillips J, Prados M, Simko J, Smith-McCune K, VandenBerg S, Roggin K, Fehrenbach A, Kendler A, Sifri S, Steele R, Jimeno A, Carey F, Forgie I, Mannelli M, Carney M, Hernandez B, Campos B, Herold-Mende C, Jungk C, Unterberg A, von Deimling A, Bossler A, Galbraith J, Jacobus L, Knudson M, Knutson T, Ma D, Milhem M, Sigmund R, Godwin AK, Madan R, Rosenthal HG, Adebamowo C, Adebamowo SN, Boussioutas A, Beer D, Giordano T, Mes-Masson A-M, Saad F, Bocklage T, Landrum L, Mannel R, Moore K, Moxley K, Postier R, Walker J, Zuna R, Feldman M, Valdivieso F, Dhir R, Luketich J, Pinero EMM, Quintero-Aguilo M, Carlotti CG, Dos Santos JS, Kemp R, Sankarankuty A, Tirapelli D, Catto J, Agnew K, Swisher E, Creaney J, Robinson B, Shelley CS, Godwin EM, Kendall S, Shipman C, Bradford C, Carey T, Haddad A, Moyer J, Peterson L, Prince M, Rozek L, Wolf G, Bowman R, Fong KM, Yang I, Korst R, Rathmell WK, Fantacone-Campbell JL, Hooke JA, Kovatich AJ, Shriver CD, DiPersio J, Drake B, Govindan R, Heath S, Ley T, Van Tine B, Westervelt P, Rubin MA, Lee JI, Aredes ND, Mariamidze A, Spellman PT, Rathmell WK, Linehan WM (2018) The Cancer Genome Atlas Comprehensive Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma. *Cell Reports* 23:313-326.e5

143. Rini BI, Atkins MB (2009) Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma. *The Lancet Oncology* 10:992–1000

144. Rini BI, McDermott DF, Hammers H, Bro W, Bukowski RM, Faba B, Faba J, Figlin RA, Hutson T, Jonasch E, Joseph RW, Leibovich BC, Olencki T, Pantuck AJ, Quinn DI, Seery V, Voss MH, Wood CG, Wood LS, Atkins MB (2016) Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of renal cell carcinoma. *J Immunother Cancer* 4:81–81

145. Safaei R, Larson BJ, Cheng TC, Gibson MA, Otani S, Naerdemann W, Howell SB (2005) Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 4:1595–1604

146. Schmelzle T, Hall MN (2000) TOR, a Central Controller of Cell Growth. *Cell* 103:253–262

147. Schubert M, Junker K, Heinzemann J (2016) Prognostic and predictive miRNA biomarkers in bladder, kidney and prostate cancer: Where do we stand in biomarker development? *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 142:1673–1695

148. Semenza GL (2001) Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends in Molecular Medicine* 7:345–350

149. Shaked Y, Ciarrocchi A, Franco M, Lee CR, Man S, Cheung AM, Hicklin DJ, Chaplin D, Foster FS, Benezra R, Kerbel RS (2006) Therapy-induced acute recruitment of circulating endothelial progenitor cells to tumors. *Science* 313:1785–1787

150. Shelke GV, Lässer C, Gho YS, Lötvalld J (2014) Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *J Extracell Vesicles* 3:
151. Simon T, Gagliano T, Giamas G (2017) Direct Effects of Anti-Angiogenic Therapies on Tumor Cells: VEGF Signaling. *Trends in Molecular Medicine* 23:282–292
152. Simpson D, Curran MP (2008) Temsirolimus. *Drugs* 68:631–638
153. Smaldone MC, Kutikov A, Egleston BL, Canter DJ, Viterbo R, Chen DYT, Jewett MA, Greenberg RE, Uzzo RG (2012) Small renal masses progressing to metastases under active surveillance: a systematic review and pooled analysis. *Cancer* 118:997–1006
154. Sonpavde G, Hutson TE (2007) Pazopanib: A novel multitargeted tyrosine kinase inhibitor. *Current Oncology Reports* 9:115–119
155. Sternberg CN, Davis ID, Mardiak J, Szczylik C, Lee E, Wagstaff J, Barrios CH, Salman P, Gladkov OA, Kavina A, Zarba JJ, Chen M, McCann L, Pandite L, Roychowdhury DF, Hawkins RE (2010) Pazopanib in Locally Advanced or Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase III Trial. *JCO* 28:1061–1068
156. Sternberg CN, Hawkins RE, Wagstaff J, Salman P, Mardiak J, Barrios CH, Zarba JJ, Gladkov OA, Lee E, Szczylik C, McCann L, Rubin SD, Chen M, Davis ID (2013) A randomised, double-blind phase III study of pazopanib in patients with advanced and/or metastatic renal cell carcinoma: Final overall survival results and safety update. *European Journal of Cancer* 49:1287–1296
157. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S (2002) Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Reviews Immunology* 2:569–579
158. Thompson R. Houston, Boorjian Stephen A., Lohse Christine M., Leibovich Bradley C., Kwon Eugene D., Cheville John C., Blute Michael L. (2008) Radical Nephrectomy for pT1a Renal Masses May be Associated With Decreased Overall Survival Compared With Partial Nephrectomy. *Journal of Urology* 179:468–473
159. Tian T, Zhu Y-L, Zhou Y-Y, Liang G-F, Wang Y-Y, Hu F-H, Xiao Z-D (2014) Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *J Biol Chem* 289:22258–22267
160. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM (2015) Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. *Cancer Cell* 27:450–461
161. TSUI K-H, SHVARTS O, SMITH RB, FIGLIN R, de KERNION JB, BELLDEGRUN A (2000) RENAL CELL CARCINOMA: PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF INCIDENTALLY DETECTED TUMORS. *The Journal of Urology* 163:426–430
162. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvalld JO (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology* 9:654–659

163. VAN DER POL E, HOEKSTRA AG, STURK A, OTTO C, VAN LEEUWEN TG, NIEUWLAND R (2010) Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8:2596–2607
164. van der Pol E, Coumans F a. W, Grootemaat AE, Gardiner C, Sargent IL, Harrison P, Sturk A, van Leeuwen TG, Nieuwland R (2014) Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *J Thromb Haemost* 12:1182–1192
165. van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G (2006) Exosomes: A Common Pathway for a Specialized Function. *The Journal of Biochemistry* 140:13–21
166. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G (2018) Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19:213–228
167. Vatten LJ, Trichopoulos D, Holmen J, Nilsen TIL (2007) Blood pressure and renal cancer risk: the HUNT Study in Norway. *British Journal of Cancer* 97:112–114
168. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R (2012) Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1820:940–948
169. Voss MH, Molina AM, Motzer RJ (2011) mTOR inhibitors in advanced renal cell carcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 25:835–852
170. Waldenström A, Genneback N, Hellman U, Ronquist G (2012) Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. *PLoS One* 7:e34653–e34653
171. Wedam SB, Low JA, Yang SX, Chow CK, Choyke P, Danforth D, Hewitt SM, Berman A, Steinberg SM, Liewehr DJ, Plehn J, Doshi A, Thomasson D, McCarthy N, Koeppen H, Sherman M, Zujewski J, Camphausen K, Chen H, Swain SM (2006) Antiangiogenic and Antitumor Effects of Bevacizumab in Patients With Inflammatory and Locally Advanced Breast Cancer. *JCO* 24:769–777
172. Wei Y, Lai X, Yu S, Chen S, Ma Y, Zhang Y, Li H, Zhu X, Yao L, Zhang J (2014) Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 147:423–431
173. 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 PHM, Bueno-de-Mesquita HB, Verschuren WMM, Ljungberg B, Hallmans G, Berglund G, González CA, Dorronsoro M, Barricarte A, Tormo MJ, Allen N, Roddam A, Bingham S, Khaw K-T, Rinaldi S, Ferrari P, Norat T, 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

174. Wu Y, Deng W, Klinke DJ 2nd (2015) Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers. *Analyst* 140:6631–6642
175. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN (2006) TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell* 124:471–484
176. Yang JC, Hughes M, Kammula U, Royal R, Sherry RM, Topalian SL, Suri KB, Levy C, Allen T, Mavroukakis S, Lowy I, White DE, Rosenberg SA (2007) Ipilimumab (anti-CTLA4 antibody) causes regression of metastatic renal cell cancer associated with enteritis and hypophysitis. *J Immunother* 30:825–830
177. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, Chen E, Schlessinger J, Francke U, Ullrich A (1987) Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 6:3341–3351
178. Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP (2015) Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *BioScience* 65:783–797
179. 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. *Int J Nanomedicine* 15:6917–6934
180. Zhou L, Liu X-D, Sun M, Zhang X, German P, Bai S, Ding Z, Tannir N, Wood CG, Matin SF, Karam JA, Tamboli P, Sircar K, Rao P, Rankin EB, Laird DA, Hoang AG, Walker CL, Giaccia AJ, Jonasch E (2016) Targeting MET and AXL overcomes resistance to sunitinib therapy in renal cell carcinoma. *Oncogene* 35:2687–2697
181. Zou W, Chen L (2008) Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology* 8:467–477
182. (1999) Interferon-alpha and survival in metastatic renal carcinoma: early results of a randomised controlled trial. Medical Research Council Renal Cancer Collaborators. *Lancet* 353:14–17

## 11. Danksagung

Hiermit möchte ich allen beteiligten Personen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Kerstin Junker für die Überlassung des Themas sowie die enorme fachliche Unterstützung bedanken.

Besonders danken möchte ich Frau Dr. rer. nat. Angela Zaccagnino für die herausragende Betreuung während der Phase der Laborarbeit und anschließend bei der Verschriftlichung der gesamten Arbeit.

Außerdem möchte ich allen Mitarbeitenden des Forschungslabors der Urologie am UKS meinen Dank aussprechen. Insbesondere Helga Angeli, die mir die Feinheiten der Zellkultur beigebracht hat und mir während der Arbeit im Labor mit Rat und Tat zur Seite stand, möchte ich Danke sagen. Bei Greta Jaschkowitz M.Sc. möchte ich mich für die Einarbeitung in die Exosomenisolation und ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre Geduld und die unterstützenden Worte während des gesamten Studiums und darüber hinaus.

Zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern bedanken. Ihr habt mir den Mut gegeben, mich allen Herausforderungen zu stellen.

## **12. Lebenslauf**

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