

Einfluss von Tyrosinkinaseinhibitoren auf das humane Nierenzellkarzinom und Immunzellen

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Kristin Schulz

geb. am 06.07.1984 in Räckelwitz

verteidigt am 27.01.2017

Gutachter:

PD Dr. Ulrich Arnold
Prof. Dr. Barbara Seliger
Prof. Dr. Christoph Clemen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung.....	8
1.1 Charakterisierung des Nierenzellkarzinoms.....	8
1.1.1 Einfluss des VHL-Genproduktes auf die Pathogenese des NZK.....	8
1.1.2 Veränderter Tumorzellmetabolismus des NZK.....	10
1.2 Das Tumormikromilieu des NZKs	12
1.2.1 Einfluss des Tumormikromilieus auf TILs.....	12
1.3 Therapieansätze zur Behandlung des NZK	13
1.4 Therapie-Resistenz des NZKs.....	17
2 Zielstellung	19
3 Material	20
3.1 Zellbiologische Methoden	20
3.1.1 Verwendete Zellen.....	20
3.1.2 Zellkulturmaterialien	21
3.1.3 Viabilität (XTT)	23
3.2 FACS-Analysen.....	23
3.2.1 Apoptoseanalysen.....	23
3.2.2 Caspase 3 Analysen	23
3.2.3 Analyse des mitochondrialen Membranpotentials.....	24
3.2.4 Proliferationsanalysen (CFSE).....	24

3.2.5	Zellzyklusanalysen	24
3.2.6	FACS.....	24
3.3	Proteinchemische Methoden	25
3.3.1	Proteomanalysen	25
3.3.2	Western Blot Analysen	28
3.4	Molekularbiologische Methoden	30
3.4.1	qRT-PCR.....	30
4	Methoden.....	33
4.1	Zellbiologische Methoden	33
4.1.1	Zellkultivierung.....	33
4.1.2	XTT-Analysen	34
4.2	Durchflusszytometrie	34
4.2.1	Analysen zur Apoptose	34
4.2.2	Analyse des mitochondrialen Membranpotentials	35
4.2.3	Caspase3-Assay.....	35
4.2.4	CFSE-Färbung zur Bestimmung der Zellproliferation	35
4.2.5	Zellzyklusanalysen	36
4.3	2D-PAGE-basierte Proteom-Analysen	36
4.3.1	Probenaufarbeitung.....	36
4.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	36
4.3.3	Differentielle Gelelektrophorese	36
4.3.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	38
4.3.5	Massenspektrometrische Methoden.....	41
4.4	Validierung differenziell exprimierter Proteine mittels Immunoblot	42
4.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Assay.....	42
4.4.2	1D-SDS-PAGE.....	42
4.4.3	Immunoblot.....	42

4.4.4	Immundetektion.....	43
4.5	Molekularbiologische Methoden	43
4.5.1	mRNA-Isolierung.....	43
4.5.2	cDNA-Synthese.....	44
4.5.3	Quantitative <i>real-time</i> -Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	44
5	Ergebnisse	46
5.1	Wirkung verschiedener Tyrosinkinaseinhibitoren auf ausgewählte Nierenzellkarzinom-Zelllinien	46
5.1.1	TKI-vermittelte Reduktion der Zellviabilität und Bestimmung der IC ₅₀ -Werte	46
5.1.2	TKI-vermittelte Inhibierung der Phosphorylierung von Rezeptortyrosinkinasen.....	46
5.1.3	TKI-vermittelte Regulation verschiedener Apoptose-assoziiierter Proteine	47
5.1.4	TKI-induzierte Veränderungen des Proteommusters verschiedener NZK-Zellen	49
5.1.5	Sunitinib-vermittelte Veränderungen der Proteinfaltungsmaschinerie.....	59
5.1.6	Zusammenfassung.....	61
5.2	Wirkung der Tyrosinkinaseinhibitoren auf Immunzellen.....	62
5.2.1	Wirkung von TKIs auf die Viabilität und Proliferation von Immunzellen.....	62
5.2.2	Immunmodulatorische Effekte von TKI	64
5.2.3	TKI-vermittelte Induktion von Apoptose in T-Zellen	67
5.2.4	Einfluss von TKI auf den Zellzyklus von Immunzellen.....	73
5.2.5	Einfluss von TKI auf das Gesamtproteom von Immunzellen.....	75
5.2.6	Zusammenfassung.....	79
5.3	Untersuchungen zur Resistenzentwicklung gegenüber TKIs im NZK	80
5.3.1	Etablierung TKI-resistenter Modellzelllinien.....	80
5.3.2	Viabilität der Sunitinib-adaptierten Zellen unter TKI-Behandlung.....	81
5.3.3	Analyse der Apoptoserate der Sunitinib- adaptierten Zellen.....	82
5.3.4	Vergleich der differentiellen Proteommuster sensibler und adaptierter Zellen zur Aufklärung der Resistenzentwicklung	84
5.3.5	Zusammenfassung.....	88

6	Diskussion.....	89
6.1	Identifizierung von Biomarkern zur Überwachung der Behandlung.....	89
6.1.1	Potentielle intrazelluläre Biomarker	89
6.1.2	potentielle extrazelluläre Biomarker.....	93
6.2	Wirkung von TKIs auf T-Zellen.....	94
6.3	Aufklärung der Resistenzentwicklung gegenüber Sunitinib im NZK	98
7	Zusammenfassung und Ausblick	101
	Literaturverzeichnis.....	103
	Curriculum Vitae.....	118
	Publikationsliste	120
	Danksagung	121
	Eidesstattliche Erklärung.....	122

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensionale
AA/PDA	Acrylamid/Piperazin-di-acrylamid
Abl	<i>abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
AKT (auch PKB)	Proteinkinase B
ALAS1	Delta-Aminolävulinatsynthase 1
ALDH1A3	Aldehyddehydrogenase Familie 1 Mitglied A3
ANXA3	Annexin A3
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	<i>American tissue culture collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAG	<i>BCL-2-associated athanogene</i>
Bak	Bcl-2 homologer Antagonistkiller
Bax	<i>Bcl-2 associated protein X</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma/leukemia-2 gene</i>
Bcr	<i>B-cell receptor</i>
BH3	<i>Bcl-2 homology 3</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
B-Raf	<i>B rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCT2	<i>T-complex protein 1 subunit β</i>
<i>cDNA</i>	<i>komplementäre DNA</i>
CFL1	Cofilin-1
CHAPS	3-[(Cholaminopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat
<i>c-KIT</i>	Stammzellfaktorrezeptor c
<i>C-Raf</i>	<i>C rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
DC	dendritische Zellen
DIGE	Differentielle Gelelektrophorese
<i>DMEM</i>	<i>dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENU	N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff
ERK	extrazellulär-regulierte Kinase
ERP29	<i>endoplasmic reticulum resident protein 29</i>
EU	Europäische Union
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>

FAC	<i>Functional annotation cluster</i>
FBS	fetales bovines Serum
FDA	<i>food and drug administration</i>
FGFR	<i>Fibroblast growth factor receptor</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GSS	Glutathionsynthetase
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IFN- α	Interferon- α
IL-2	Interleukin-2
IPG	immobilisierter pH-Gradient
kDa	Kilodalton
KK	Kolonkarzinom
KRT8	Keratin, <i>type II cytoskeletal 8</i>
LGALS1	Galectin-1
LMNA	Prelamin-A/C
MALDI-TOF MS	Matrixassistierte-Laserdesorption/Ionisations- <i>time of flight</i> -Massenspektrometrie
MDSC	myeloide Suppressorzellen
Mcl-1	<i>Induced myeloid leukemia cell differentiation protein</i>
MEK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NDSB-201	3-(1-Pyridino)-1-propan-sulfonat
NDUFS3	NADH-Dehydrogenase-[Ubichinon]-Eisen- Schwefelprotein 3
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B- cells</i>
NOXA	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
NZK	Nierenzellkarzinom
p53	Tumorsuppressor (53 kDa)
PAFAH1B3	<i>platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF/R	<i>platelet derived growth factor/receptor</i>
PEBP1	Phosphatidylethanolamin-bindprotein 1
PHA-M	Phytohemagglutinin
PI	Propidiumiodid
pI	isoelektrischer Punkt
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase

POLR2B	RNA Polymerase II
PRDX1	Peroxiredoxin-1
PUMA	p53 <i>upregulated modulator of apoptosis</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	<i>Quantitative real-time PCR</i>
RAB	Rabilloud
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RNA	Ribonukleinsäure
Ripa	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RNase	Ribonuklease
RPMI	<i>roswell park memorial institut</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>Taq</i>	<i>thermus aquaticus</i>
TBCA	<i>tubulin-specific chaperone A</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- α	<i>transforming growth factor α</i>
TIL	Tumor-infiltrierende Lyphozyten
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
Treg	regulatorische T-Zellen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Handelsname für Polysorbat
TXNRD1	Thioredoxinreduktase 1
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
VDAC3	<i>voltage-dependent anion-selective channel protein 3</i>
VEGF/R	<i>vascular endothelial growth factor/receptor</i>
VHL	von Hippel-Lindau
WT	Wildtyp
XTT	Na-3,3'-[1-(phenylamino)-carbonyl-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)-benzol-sulfonsäurehydrat
% v/v	<i>percent volume per volume</i>
% w/v	<i>percent weight per volume</i>

1 Einleitung

1.1 Charakterisierung des Nierenzellkarzinoms

Das Nierenzellkarzinom (NZK) stellt die 16. häufigste Todesursache weltweit dar (Znaor et al. 2015) und ist mit einer Häufigkeit von 90 % aller diagnostizierten bösartigen Veränderungen die verbreitetste Tumorerkrankung der Niere (Borje Ljungberg et al. 2015). Zudem stellt das NZK mit 2-3 % aller diagnostizierten Malignome die zehnthäufigste Tumorerkrankung in den westlichen Industriestaaten dar, wobei Männer doppelt so oft betroffen sind als Frauen (Brian I. Rini, Campbell, and Escudier 2009). Das NZK wird in verschiedene Subtypen unterteilt. Man unterscheidet klarzellige, papilläre, chromophobe, Sammelrohr- und unklassifizierte Tumore. Mit 75-85 % ist das klarzellige NZK (ccNZK) die am häufigsten auftretende Form des NZK (Linehan et al. 2004; Brian I. Rini, Campbell, and Escudier 2009). Es zeichnet sich durch hohe zytoplasmatische Glycogen- und Lipidkonzentrationen aus (Börje Ljungberg et al. 2010). Die Entstehung des ccNZK wird mit dem Verlust des Von-Hippel-Lindau (VHL-) Genproduktes (pVHL) in Verbindung gebracht. Dieses als Tumorsuppressor klassifizierte Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 (3p25-26) codiert. Patienten mit dem Von-Hippel-Lindau Syndrom haben von Geburt an einen Defekt in einem Allel. Wird auch das zweite Allel geschädigt, treten in den betroffenen Geweben Tumore auf (Latif et al. 1993). Auch bei Patienten mit spontan auftretendem ccNZK konnte häufig eine Inaktivierung beider Allele des VHL-Gens festgestellt werden (E. Cho, Adami, and Lindblad 2011). Dabei weist ein Allel meist eine Mutation oder Methylierungen auf, die zum Funktionsverlust führt. Das zweite Allel ist deletiert (Herman et al. 1994). Papilläre NZKs (pNZK) stellen 10-15 % der diagnostizierten NZK dar und zeigen vielfältige genetische Mutationen, wie Trisomien der Chromosomen 3p, 7, 8, 12, 16, 17 und 20. Mutationen des c-Met-Gens auf Chromosom 7 (Gibney et al. 2013) oder des Gens der Fumarat-Hydratase (FH) auf Chromosom 1 treten häufig im pNZK auf (Algaba et al. 2011). Das chromophobe NZK (4-5 % der diagnostizierten NZK) zeichnet sich durch trübes oder granuläres eosinophiles Zytoplasma und den für den Patienten besten klinischen Verlauf aus. Im chromophoben NZK treten häufig Verluste der Chromosomen 1, 2, 6, 10, 13, 17 und 21, sowie die verstärkte Transkription des Proto-Onkogens c-Kit auf (Warrick et al. 2014). Hochdurchsatztechnologien haben eine Vielzahl von weiteren Genen, microRNAs (miRs) und Proteinen identifiziert, die an der Entstehung eines Nierentumors beteiligt sind. Beispielhaft zu nennen sind hierbei Mutation im Birt Hogg Dubé (*BHD*) Gen, was zum Funktionsverlust des BHD Proteins führt. Obwohl BHD-Mutationen typisch für chromophobe NZK sind (83 %), finden sie sich auch in ccNZKs (5 %) (Khoo et al. 2003). Mutationen von FH wurden ebenfalls für ccNZK beschrieben (Sudarshan et al. 2011). Außerdem finden sich Mutationen im *tuberous sclerosis complex* Protein (TSC) 1 und 2 (Parry et al. 2001), sowie in der Succinat-Dehydrogenase (Furge, MacKeigan, and Teh 2010).

1.1.1 Einfluss des VHL-Genproduktes auf die Pathogenese des NZK

pVHL ist Bestandteil des E3-Ubiquitin Ligase-Komplexes. Dieser bindet unter normoxischen Bedingungen an die α -Untereinheit des *Hypoxia-inducible factor* (HIF)-1 α bzw. HIF-2 α , der dadurch zur proteolytischen Spaltung adressiert wird (Pinthus et al. 2011). Als verantwortlich für die Tumorprogression wurde HIF-2 α identifiziert. HIF-1 α reguliert u.a. die Transkription pro-apoptotischer Faktoren (Gossage, Eisen, and Maher 2015). Das genaue Zusammenspiel

beider Faktoren konnte bisher noch nicht hinreichend geklärt werden. Der Verlust von pVHL führt zur Stabilisierung von HIF α . Die Interaktion mit HIF β resultiert in der Bildung eines heterodimeren Komplexes, der als Transkriptionsfaktor spezifische Zielgene induziert, die zur Anpassung an sauerstoffarme Bedingungen notwendig sind. Zu den mehr als 200 bisher identifizierten Zielgenen gehören u.a. die Wachstumsfaktoren *transforming growth factor* (TGF)- α , *platelete derived growth factor* (PDGF) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF), sowie das Ligand-/Rezeptor-Paar *stromal-derived factor* (SDF1)/CXCR4 und Komponenten des *mammalian target of rapamycin* (mTOR) (W. Liu et al. 2012).

Die Inaktivierung des VHL-Gens hat demnach unter anderem eine kontinuierliche Überexpression von VEGF und PDGF zur Folge, was eine anhaltende Stimulation der korrespondierenden Rezeptoren verursacht (Takahashi, Sasaki, and Kim 1994). Die daraus resultierende dauerhafte Überexpression der Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) hat eine Deregulation des Zellwachstums zur Folge und spielt eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese und Tumorprogression. VEGF bindet an seine korrespondierenden Rezeptoren VEGFR-1 und -2. VEGFR-1 wird ebenfalls HIF-abhängig transkribiert und liegt in Tumorzellen hochreguliert vor (Ferrara, Gerber, and LeCouter 2003). Abbildung 1.1 zeigt am Beispiel des EGF-Rezeptors den schematischen Aufbau einer RTK.

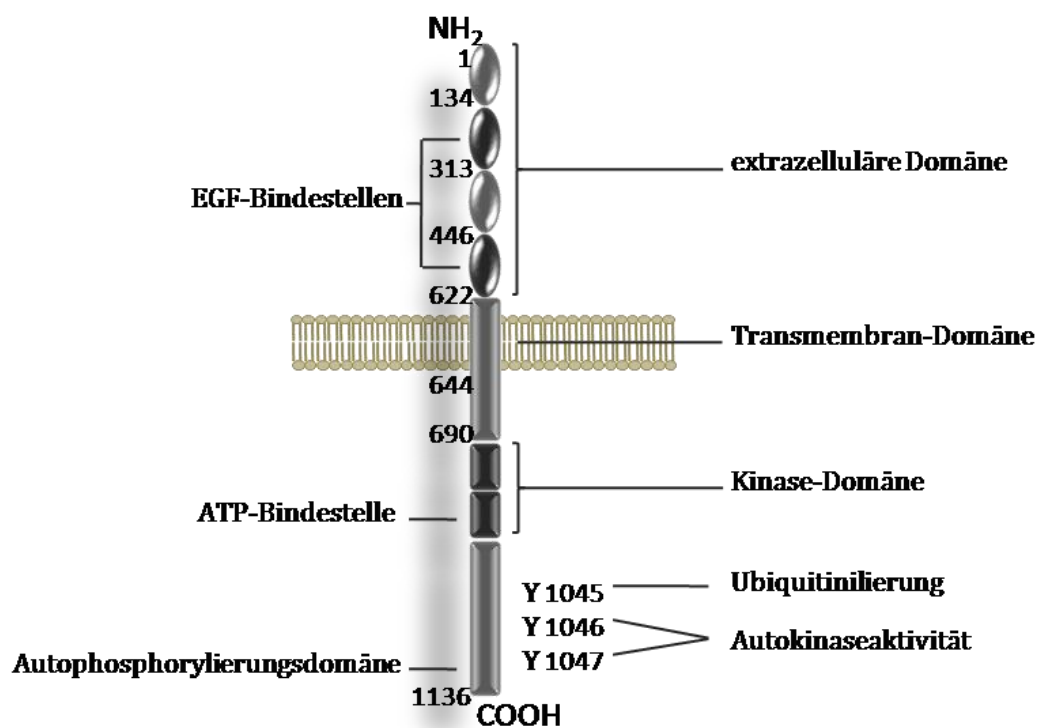


Abbildung 1.1 Schematischer Aufbau des EGF-Rezeptors

Der EGFR besteht aus einer extrazellulären, Transmembran- und intrazellulären Domäne. In der hochkonservierten, intrazellulären Domäne befindet sich die Kinasedomäne. Die Extrazelluläre Domäne ist weniger konserviert innerhalb der EGFR-Familie und besitzt 4 Unterdomänen. Es handelt sich hierbei um 2 Ligandenbindungsdomänen und zwei Cysteine-reiche Rezeptordimerisierungsdomänen. Zwischen extra- und intrazellulärer Domäne liegt die hydrophobe Transmembrandomäne.

RTKs bilden nach der Bindung ihres spezifischen Liganden Dimere, was zur Autophosphorylierung eines Tyrosinrestes der intrazellulären Domäne und somit zur Aktivierung der Kinasedomäne führt. Dies hat die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden zur Folge. VEGF fungiert als Wachstumsfaktor, Überlebensfaktor und in Endothelzellen zusätzlich als vaskulärer Permeabilitätsfaktor, was ihm eine Rolle bei der Metastasierung einräumt (Ferrara, Gerber, and LeCouter 2003). Die Wirkung der Wachstumsfaktoren ist also nicht auf die Tumorzelle selbst beschränkt. Die sezernierten Faktoren wirken auch auf die umliegenden Gefäßzellen und stimulieren dort ebenfalls Wachstum (Neo-Angiogenese) und Überleben der Zellen.

Der wohl am besten untersuchte Signalweg ist der PI3K/Akt/mTOR Signalweg. Dieser wird auch als Überlebenssignalweg bezeichnet und spielt sowohl in der Tumorzelle als auch den umliegenden Gefäßzellen eine entscheidende Rolle (Polivka and Janku 2014). Er reguliert Proliferation, Differenzierung, Organisation des Zytoskeletts, sowie den Metabolismus der Zelle. Der Signalweg wird, wie in Abbildung 1.2 dargestellt, unter anderem durch die RTK-abhängige Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase initiiert. Diese bildet Phosphatidylinositol (3,4,5)- trisphosphat (PIP3). Dies führt wiederum zur Phosphorylierung der Serin-Threonin-Kinase AKT, die die Inhibierung von mTOR aufhebt (P. Liu et al. 2009). Im NZK finden sich auch somatische Mutationen von mTOR, die zu einer dauerhaften Aktivierung führen (Polivka and Janku 2014). Beides hat eine Hochregulation der Proteinbiosynthese zur Folge und geht mit einer schlechten Prognose für den Patienten einher (Hudes 2009). Ein Zielgen von mTOR ist HIF α selbst (Brian I. Rini, Campbell, and Escudier 2009). Es ergibt sich dadurch eine zusätzliche positive Verstärkung.

1.1.2 Veränderter Tumorzellmetabolismus des NZK

Sowohl HIF α als auch mTOR regulieren die Transkription von Zielgenen die den Metabolismus des NZK beeinflussen. Zu den wichtigsten HIF-regulierten Genen gehören neben den bereits genannten Wachstumsfaktoren auch Gene des Glukose-Metabolismus, darunter der Glukose-Transporter GLUT1 (Gossage, Eisen, and Maher 2015). Die dauerhafte Präsenz von HIF α führt dadurch zu einer höheren Glukose-Aufnahme in die Zelle. Wie bereits Otto Warburg postulierte, produzieren Tumorzellen trotz aerober Bedingungen mehr Milchsäure als normale Zellen (Warburg, Posener, and Negelein 1924). Gesunde Zellen decken ihren Energiebedarf durch oxidative Phosphorylierung. Glukose wird dabei zunächst in Pyruvat und anschließend zu Acetyl-CoA umgesetzt, welches dann im Citratzyklus innerhalb der Mitochondrien unter NADH-Bildung und Sauerstoff-Verbrauch oxidiert wird (Saraste 1999). Ist die Sauerstoffversorgung eingeschränkt, nutzen Zellen die anaerobe Glykolyse, um ATP zu generieren. Hierbei wird Pyruvat zu Laktat reduziert. NZK-Zellen zeigen aufgrund ihres veränderten VHL-Status und dem dadurch akkumulierten HIF α eine Vielzahl von Veränderungen, die die aerobe Glykolyse begünstigen (L. Yu et al. 2016). HIF reguliert die Expression der Laktatdehydrogenase (LDH), die Pyruvat zu Laktat umsetzt. Und auch der *monocarboxylat transporter 4* (MCT4), der Laktat aus der Zelle schleust, ist HIF-reguliert. Die Pyruvat-Dehydrogenase Kinase 1 (PDK1) gehört ebenfalls zu den HIF-regulierten Proteinen. Sie phosphoryliert die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) und inaktiviert sie somit. Dadurch kann Pyruvat nicht zu Acetyl-CoA umgesetzt werden und akkumuliert, was die Glykolyse zu Laktat begünstigt. Alternativ zur Glukose, metabolisieren Tumorzellen außerdem Glutamin, um den Citratzyklus aufrecht zu erhalten. Auch dies führt zur Akkumulation von Pyruvat. NZKs nutzen daher trotz ausreichender Sauerstoffversorgung die Glykolyse, die sogenannte aerobe Glykolyse, zur ATP-Generierung. Sauerstoff ist dadurch kein

limitierender Faktor für das Tumorwachstum (Pinthus et al. 2011). Die ausgeschleuste Milchsäure hat die Induktion weiterer Oncogene zur Folge und schafft ein saures Mikromilieu. Dies schützt den Tumor vor der Immunantwort des Körpers und erleichtert durch pH-vermittelte Matrixdegradation die Metastasierung. Aufgrund der Reduktion der oxidativen Phosphorylierung, findet sich im VHL-negativen NZK eine Herunterregulation von Proteinen der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung, sowie des mitochondrialen DNA-Gehalts im Vergleich zu normalem Gewebe. Dies ist verknüpft mit einer Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), was zusätzliche Zellschädigungen und DNA-Mutationen begünstigt (M. Jang, Kim, and Lee 2013).

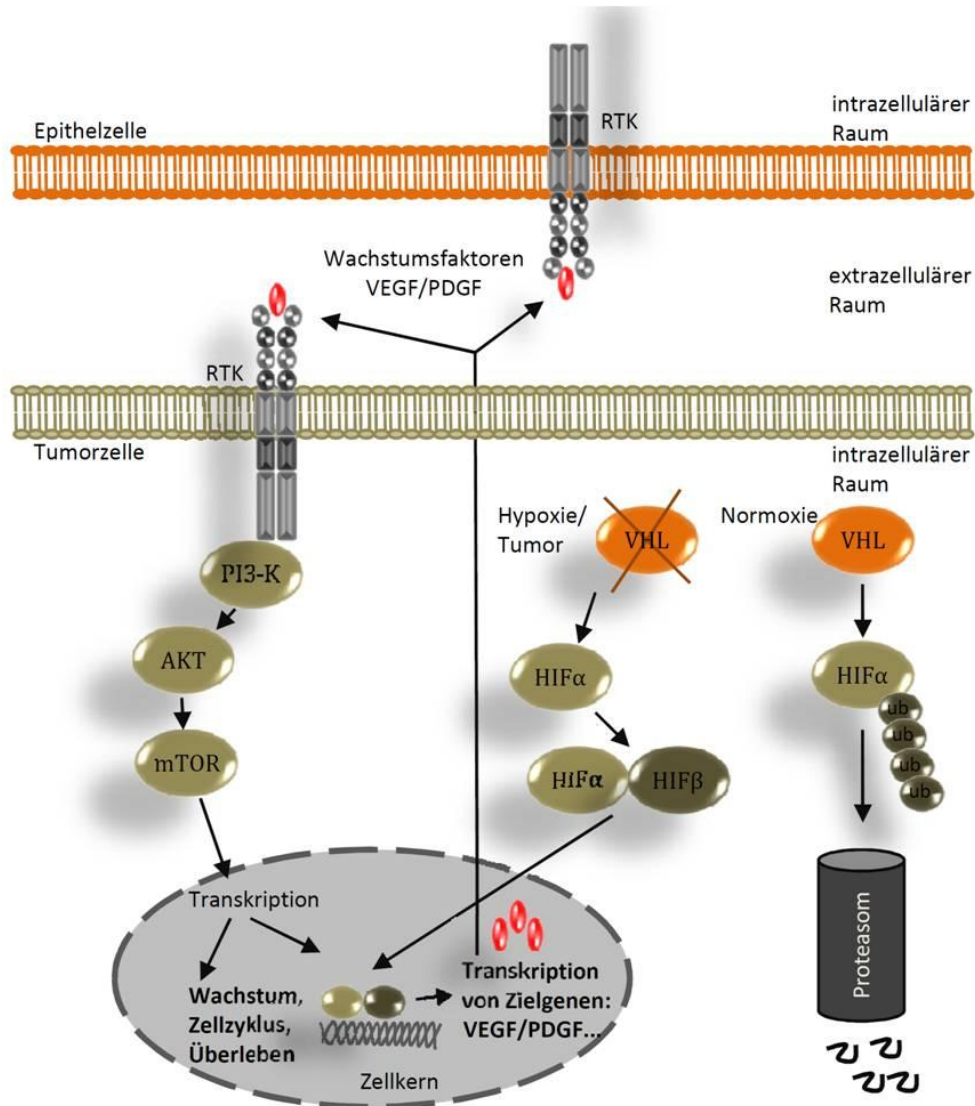


Abbildung 1.2 Signalkaskaden des NZK

Der Verlust des VHL-Genproduktes führt innerhalb der Tumorzelle zur Ausprägung eines hypoxischen Phänotyps. Gene, die zur Erhaltung der Lebensfunktionen der Zelle unter Sauerstoffarmen Bedingungen notwendig sind, werden exprimiert. Dies führt unter anderem zur Produktion von Wachstumsfaktoren, die sowohl an der zelleigenen RTK als auch an die angrenzenden Epithelzellen binden. Innerhalb der Tumorzelle werden dadurch tieferliegende Kinasen, wie PI3K, AKT und mTOR, aktiviert, was zur Transkription weiterer Gene, die das Überleben der Tumorzelle sichern, führt. Die Epithelzellen werden ebenso zur Teilung angeregt, was die Vaskularisierung des Tumors begünstigt.

1.2 Das Tumormikromilieu des NZKs

Ein solider Tumor setzt sich aus verschiedenen zellulären Bestandteilen zusammen. Durch die zuvor beschriebenen Veränderungen der zellulären Signalkaskaden setzt der Tumor verschiedene Faktoren ins Mikromilieu frei, was dieses aktiv moduliert. Der Tumor nimmt unter anderem Einfluss auf die Vaskularisation, den interstitiellen Druck, die Versorgung mit Sauerstoff, den pH-Wert, den bioenergetischen Status, die Laktat-Konzentration und die Konzentration reaktiver Metabolite (ROS, NOS) (David W. Hoskin et al. 2008). Neben den proliferierenden Tumorzellen finden sich im unmittelbaren Umfeld einer Tumorzelle endotheliale Zellen, Tumor-infiltrierende Immunzellen (TIL) und eine Vielzahl von assoziierten Zellen des umliegenden Gewebes (T L Whiteside 2008). In Abbildung 1.3 ist das Tumormikromilieu im Überblick dargestellt.

1.2.1 Einfluss des Tumormikromilieus auf TILs

Die Tumor-infiltrierenden Immunzellen stellen eine heterogene Zellpopulation dar. Es finden sich sowohl Zellen der adaptiven Immunantwort, wie verschiedene T-Zellpopulationen und im geringeren Maße auch B-Zellen, als auch Zellen der angeborenen Immunantwort, wie dendritische Zellen (DC), Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM), neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK), sowie myeloide Suppressorzellen (MDSCs) (T. Whiteside 2008). Das NZK gilt durch seine hohe Rate an infiltrierenden Immunzellen als immunabhängiger Tumor (Theresa L. Whiteside 2006). Patienten, die einer immunsuppressiven Behandlung unterliegen, bilden vergleichsweise häufiger Tumore in der Niere aus (Lien et al. 1991). Die Aktivität der Immunzellen hängt vom Tumor-generierten Mikromilieu ab. Die Tumorzellen sezernieren Faktoren, welche die Immunzellantwort negativ beeinflussen, wie z.B. Laktat, Interleukin-10 und TGF β . Diese Faktoren verhindern die Reifung von DCs und verhindern, dass zytotoxische T-Zellen (CTL: CD3⁺/CD8⁺) die Tumorzellen angreifen. Die im NZK häufig anzutreffende Expression und Oberflächenpräsentation des humanen Leukozyten Antigen (HLA-)G sorgt zusätzlich für die Unterdrückung der Funktion von DC, CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen (B. L. Li et al. 2009). Zudem wandern vermehrt regulatorische T-Zellen (Treg; CD4⁺, CD25⁺ FoxP3⁺) und MDSCs in das Tumorgewebe ein. Diese sind in der Lage, die T-Zellantwort zu unterdrücken (Minárik et al. 2013). Dies hat Auswirkungen auf verschiedene Therapiemethoden, wie die Vakzinierung oder den adoptiven T-Zelltransfer. Neben den Tumorzellen selbst sind die Tumor-assoziierten Makrophagen eine wichtige Quelle von im Tumormikromilieu vorliegendem Il-10 und der Indolamin-2,3-Desoxigenase (IDO). Diese wird auch von dendritischen Zellen gebildet und baut das für T-Zellen essentielle Tryptophan ab. Der Mangel dieser Aminosäure und der korrespondierenden Metabolite hat zur Folge, dass die Proliferation der T-Zellen eingeschränkt wird und fördert Anergie und Apoptose der T-Zellen (Uyttenhove et al. 2003). Reaktive Metabolite (ROS, NOS) hemmen die Proliferation von Immunzellen oder induzieren Apoptose (D W Hoskin et al. 2008). Das durch den veränderten Metabolismus der Tumorzelle verstärkt sekretierte Laktat unterdrückt die Zytokinsynthese in CD8⁺ T-Zellen, was deren Zytotoxizität stark einschränkt (Hadrup, Donia, and Thor Straten 2013). Sowohl die Sauerstofflimitierung als auch das sezernierte Laktat im Tumor-Inneren schränken Differenzierung, Aktivierung und Migration von DC ein (Gottfried et al. 2006).

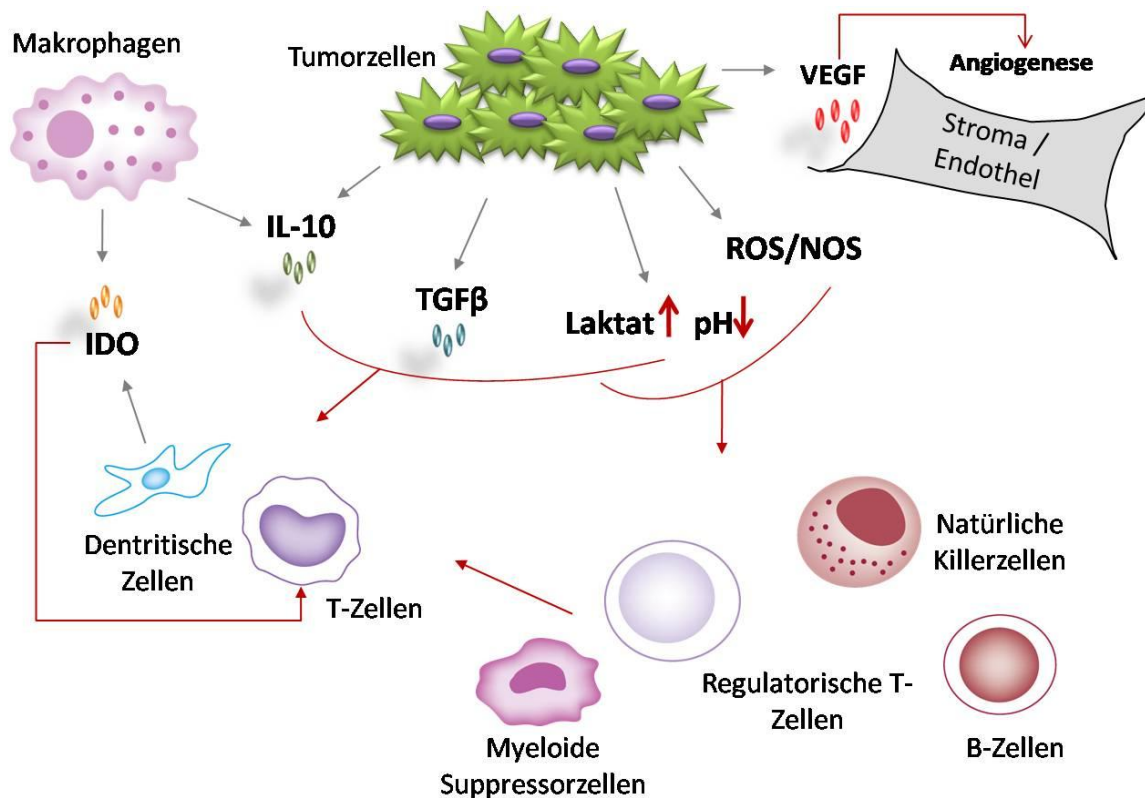


Abbildung 1.3 Tumormikromilieu des NZK

Das Tumormikromilieu setzt sich aus verschiedenen zellulären und molekularen Bestandteilen zusammen. Der Tumor ist infiltriert von einer Vielzahl von Immunzellen, darunter Makrophagen, verschiedene T-Zell-Subtypen, MDSCs als auch Epithelzellen der umgebenden Blutgefäße. Sowohl vom Tumor selbst als auch von den infiltrierenden Zellen werden zudem verschiedene Moleküle, wie IL-10, TGFβ, Laktat, Wachstumsfaktoren und ROS, sezerniert. Diese beeinflussen die einzelnen Zellen hinsichtlich Proliferation und Aktivität.

1.3 Therapieansätze zur Behandlung des NZK

Die partielle oder radikale Entfernung der Niere (Nephrektomie) ist nach wie vor die bevorzugte Therapieform bei Tumoren mit Tumorgrad T1 (< 7 cm, auf Niere begrenzt) und T2 (> 7 cm, auf Niere begrenzt) (Borje Ljungberg et al. 2015). Bei Tumoren > 7 cm und einer Beteiligung des umgebenden Gewebes (T3 und T4) wird zunächst versucht, mit systemischen, zielgerichteten Therapien den Tumor zu schrumpfen (bis zu 9,6 %), um ihn dann radikal zu entfernen (Penticuff and Kyprianou 2015). Das metastasierte NZK (mNZK) stellt die Chemotherapie-resistenteste bösartige Veränderung von Geweben dar. Zurzeit laufen verschiedene klinische Phase III Studien (CARMENA und SURTIME) zur kombinatorischen Therapie mit VEGF-Inhibitoren und anschließender radikaler Nephrektomie des mNZK (Penticuff and Kyprianou 2015). Dies soll die Anzahl der Wachstumsfaktor- und Zytokin-ausschüttenden Zellen, sowie der potentiell metastasierenden Zellen möglichst stark reduzieren (B I Rini and Atkins 2009). Dies resultierte nahezu in einer Verdopplung der Gesamtüberlebenszeit der Patienten (Flanigan et al. 2004). In den letzten 20 Jahren wurden 51 Phase II Studien mit 33 verschiedenen Chemotherapeutika gegen das NZK durchgeführt. Keine Kombination zeigte eine Verbesserung zu Interferon α (INF-α) oder Interleukin 2 (Il-2) (Penticuff and Kyprianou 2015). Aber auch diese beiden Therapeutika zeigen lediglich Ansprechraten von 10-20 % (Motzer and Russo 2000) mit einer nur gelegentlich auftretenden heilenden Wirkung (Bernard Escudier et al. 2007a). Beide

Substanzen stimulieren das Immunsystem unspezifisch (McDermott and Atkins 2008). Ihr Einsatz resultiert auf der Beobachtung, dass das NZK, wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, stark von Lymphozyten infiltriert wird. Il-2 ist seit 1992 in hohen Dosen zur Behandlung des mNZK zugelassen. Jedoch konnte kein Unterschied zwischen hohen und niedrigen Dosen IL-2 nachgewiesen werden (Yang et al. 2003). Außerdem zeigen sich starke Nebenwirkungen, wie die erhöhte Durchlässigkeit der Kapillargefäße und dadurch auftretende Ödeme (Brian I. Rini, Campbell, and Escudier 2009). INF- α kommt nach erfolgloser Il-2-Behandlung zum Einsatz. Aber auch diese Kombination bringt keine erhöhten Überlebensraten (B Escudier et al. 1999).

Basierend auf den bisher bekannten Erkenntnissen der zu Grunde liegenden molekularen Veränderungen des NZK wurden neue Medikamente entworfen, die an spezifische Zielstrukturen binden. Im Fokus stehen dabei aberrante Signalwege des Tumorstoffwechsels, mit besonderem Augenmerk auf die HIF- bzw. VHL-regulierten Signalkaskaden. Antikörper, Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) und mTOR-Inhibitoren wurden entwickelt, um die Ligandenbindung, die Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasen bzw. der intrazellulären Kinasen zu blockieren. Diese wirken sowohl auf die Signalwege innerhalb der Tumorzellen als auch auf die umliegenden Gefäßzellen (Angiogenese) (B. Escudier 2012; B I Rini, Campbell, and Escudier 2009). Die zurzeit zugelassenen Medikamente zur Behandlung des NZK sind in Tabelle 1.1 aufgelistet.

1.1 Zugelassene Wirkstoffe für die zielgerichtete Tumortherapie

Wirkstoff	Zielstrukturen	Zulassungsstudie	Dosis und Anwendungsdauer
Sorafenib	VEGFR, PDGFR, RET, c-Kit, Flt-3, Raf-Kinase	NCT00478114	400mg, 2 mal täglich
Sunitinib	VEGFR, PDGFR, c-Kit, Flt-3, CSF-1R	NCT00480935	50 mg, 1 mal täglich über 4 Wochen mit 2 Wochen Pause im Anschluss
Axitinib	VEGFR	NCT01649180	5 mg, 2 mal täglich
Pazopanib	VEGFR, PDGFR, c-Kit, FGFR	NCT00334282	800 mg, 1 mal täglich
Bevacimumab	VEGF	NCT00113217	10 mg/kg Körpergewicht, alle 2 Wochen
Temsirolimus	mTOR	NCT01072890	25 mg, einmal wöchentlich
Everolimus	mTOR	NCT00788060	10 mg, einmal täglich

Die erste Zielstruktur war der *vaskular endothelial growth factor* (VEGF) und sein korrespondierender Rezeptor (VEGFR). In Kombination mit $\text{INF}\alpha$ wird der humanisierte Antikörper Bevacizumab (Avastin®, Roche) seit 2007 zur Behandlung des metastasierten NZK mit einer Verdopplung des Progress-freien Überlebens (10.2 vs. 5.4 Monate) angewendet (Bernard Escudier et al. 2007b). Bevacizumab neutralisiert alle Hauptisoformen von VEGF und verhindert so dessen Bindung an seinen Rezeptor, was wiederum die Aktivierung der tiefer gelegenen Signalwege blockiert (Oosterwijk et al. 2008). Dasselbe Ziel verfolgen die TKI-basierten Therapieansätze. Bei den momentan zugelassenen TKI handelt es sich um ATP-kompetitive niedermolekulare Substanzen, die oral verabreicht werden. Sorafenib (Nexavar®, Bayer AG) wurde 2005 von der amerikanischen „*Food and Drug Administration*“ (FDA) zur Behandlung des fortgeschrittenen, metastasierten NZK zugelassen (S. Wilhelm et al. 2006). Sorafenib inhibiert die Neoangiogenese, indem es intrazellulär an der Tyrosinkinasedomäne des VEGFR (VEGFR-1, -2, -3) und seinen Verwandten Rezeptoren PDGFR- β , RET, c-Kit und *Fms-like tyrosine kinase-3 receptor* Flt-3 bindet. Sorafenib inhibiert außerdem die Proliferation der Tumorzelle, indem es die Raf-Kinase inaktiviert (M. A. Fabian et al. 2005; S. M. Wilhelm et al. 2004). Es wird als Zweitlinientherapie nach gescheiterter $\text{IFN}\alpha$ oder IL-2 Behandlung eingesetzt, wenn diese Therapien nicht geeignet sind oder die Zellen Resistenzen gegenüber spezifischeren TKI entwickelt haben (Brian I Rini et al. 2011). Ein ähnlich wirkender Inhibitor ist Sunitinib (Sutent®, Pfizer INC). Dieser inhibiert die Aktivität von Kinasen sowohl in Tumorzellen als auch in Endothelzellen und Perizyten durch die Blockierung von VEGFR-1, -2 und -3, PDGFR- α und - β , RET, c-Kit, den Makrophagen-*colony-stimulating factor* CSF-1R und Flt-3 (M. a Fabian et al. 2005). Sunitinib ist seit 2007 als Erstlinientherapie zur Behandlung des metastasierten NZK von der FDA zugelassen (Chow and Eckhardt 2007). Im Vergleich mit einer $\text{IFN}\alpha$ behandelten Kontrollgruppe zeigte sich eine Verlängerung des Progress-freien Überlebens (PFS) von 5 Monaten auf 11 Monate (Motzer et al. 2007). Allerdings treten Nebenwirkungen, wie Diarrhö über Bluthochdruck bis hin zu Herzversagen auf. Pazopanib (Votrient®, GlaxoSmithKline) ist ein Multikinaseinhibitor der zweiten Generation und wurde 2009 zur Behandlung des fortgeschrittenen NZK von der FDA zugelassen. Es wird sowohl als Erstlinientherapie als auch nach gescheiterter Zytokinbehandlung eingesetzt (Schutz, Choueiri, and Sternberg 2011). Pazopanib zeichnet sich durch eine bessere Inhibierung des VEGFR-2 und verringerte Nebenwirkungen aus. Es blockiert ebenfalls VEGFR, PDGFR und c-Kit, sowie den *fibroblast growth factor receptor* (FGFR). Erste Studien zum PFS waren vielversprechend mit 9,2 Monaten im Vergleich zur Placebo-Gruppe mit 4,2 Monaten (Sternberg et al. 2010). Neuere Untersuchungen konnten diese Ergebnisse jedoch nicht untermauern. Das PFS wurde nicht signifikant zur Kontrollgruppe verlängert (Sternberg et al. 2013). Auch eine Kombination mit Bevacimumab wird zurzeit klinisch untersucht (Penticuff and Kyprianou 2015). 2012 wurde Axitinib (Inlyta®, Pfizer INC) als Zweitlinientherapeutikum zur Behandlung des fortgeschrittenen NZK von der FDA zugelassen. Es handelt sich hierbei um einen stark selektiven Inhibitor für VEGFR-1, -2 und -3. Axitinib hemmt die VEGF-vermittelte endotheliale Zellproliferation und ist zudem in der Lage die Apoptose zu beeinflussen (Grunwald and Merseburger 2012). Im Gegensatz zu den vorher genannten TKIs ist Axitinib in der Lage den VEGFR bereits im picomolaren Bereich zu inhibieren, wodurch der Einsatz von wesentlich geringeren Dosen möglich wird (Hu-Lowe et al. 2008). Weitere Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren, unter anderem Dovitinib (TKI 258, Novartis) und Tivozanib (AV-951, AVEO Pharmaceuticals) befinden sich zurzeit in klinischen Studien. Eine Liste der zurzeit in Studien untersuchten Wirkstoffe findet sich in Tabelle 1.2.

Tabelle 1.2 Nicht-zugelassene Wirkstoffe für die zielgerichtete Therapie des NZK

Wirkstoff	Zielstruktur	Phase und klinische Studie	angestrebte Anwendung
Tivozanib	VEGFR, PDGFR, c-Kit	III (NCT01076010)	Im Vergleich mit Sorafenib getestet
IMA901	Impfstoff gegen Tumorantigene	III (NCT00523159)	In Kombination mit Sunitinib für das fortgeschrittene NZK
AGS003	Impfstoff gegen Tumorantigene	III (NCT01582672)	Wird z.Z. im Vergleich mit Standardbehandlung getestet
AMG-386	Ang-1, Ang-2	II (NCT00853372)	Erstlinientherapeutikum nach Versagen von Sunitinib- und Zytokin- Behandlung
Regorafenib	VEGFR, FGFR, PDGFR	II (NCT00664326)	Als Erstlinientherapeutikum für mNZK
Cediranib	VEGFR, PDGFR, c-Kit	II (NCT00423332)	Als Erstlinientherapeutikum für NZK und mNZK
Dovitinib	VEGFR, FGFR	II (NCT01791387)	Als Erstlinientherapeutikum
Aflibercept	VEGF-A, PlGF	II (NCT00357760)	Als Erstlinientherapeutikum für das fortgeschrittene mNZK
Ramucirumab	VEGFR-2	II (NCT01282463)	Als Zweitlinientherapeutikum in Kombination mit IMC-18F1 mit und ohne Docetaxel
GDC-0980	PI3K/TORC1/TORC2	II (NCT01442090)	Im Test gegen Everolimus nach anti-VEGF Therapie-Versagen
MK2206	Akt	II (NCT01239342)	Im Test gegen Everolimus im resistenten NZK
Nivolumab	PD1	II (NCT01472081)	In Kombination mit Sunitinib, Pazopanib oder Ipilimumab im mNZK
Ipilimumab	CTLA-4	I (NCT01750983)	In fortgeschrittenen Tumoren
INK-128	TORC1/TORC2	I (NCT02142803)	In Kombination mit Bevacimumab im Glioblastom oder fortgeschrittenen soliden Tumoren
BKM120	PI3K	I (NCT01283048)	In Kombination mit Bevacimumab im mNZK
SF1126	PI3K/TORC1/TORC2	I (NCT02337309)	Bei Patienten mit Rückfall oder resistenten Neuroblastomen
BEZ235	PI3K/TORC1/TORC2	I (NCT01508104)	In Kombination mit Everolimus bei fortgeschrittenen soliden Tumoren

Auch mTOR ist eine Zielstruktur für Tumorthérapien. Die mTOR-Inhibitoren Temsirolimus (Torisel®, Pfizer INC) und Everolimus (Aficitor®, Novartis Pharmaceuticals) sind beide für die Behandlung des NZK zugelassen (Temsirolimus 2007 und Everolimus 2009). Temsirolimus erzielte in einer Phase III Studie ein PFS von 10,9 Monaten im Vergleich zu INF- α Behandlung mit 7,3 Monaten (Hudes 2009). Everolimus wird als Zweitlinientherapeutikum nach erfolgloser Behandlung mit Bevacimumab oder TKIs eingesetzt (Hudes 2009). Der Einsatz von VEGFR- und mTOR- Inhibitoren hat die Behandlung des NZK drastisch beeinflusst. Allerdings sind die 5 Jahresüberlebensraten von NZK-Patienten mit 10 % nach wie vor schlecht. Die Mehrheit der Patienten entwickeln Resistenzen gegenüber der Behandlung mit Inhibitoren.

1.4 Therapie-Resistenz des NZKs

Im Verlauf einer Behandlung entwickeln fast alle Patienten mit NZK Resistenzen gegenüber den angewendeten TKI oder sprechen von Beginn an nicht auf die Therapie an (Larriba et al. 2012). Diese Resistenzen sind entweder angeboren (intrinsisch) oder erworben (extrinsisch) (Rubin and Duensing 2006). Die angeborenen Resistenzen sind meist auf spezifische Mutationen im Zielgen des entsprechenden TKI zurückzuführen, sind aber sehr selten. Die Behandlung führt dabei zu einer Selektion der bereits resistenten Klone innerhalb des sehr heterogenen Tumorgewebes (Ruiz et al. 2011). Auch das Vorhandensein von pro-angiogenetischen Faktoren, wie dem *fibroblast growth factor-2* (FGF2) oder inflammatorischer Zellen, vor allem von CD11b⁺Gr1⁺ myeloiden Suppressor-Zellen (MDSC), kann den Erfolg der TKI-Behandlung negativ beeinflussen (Shojaei et al. 2007; Welti et al. 2011). Weitaus wichtiger ist jedoch die erworbene Resistenz. Nahezu alle NZK Patienten entwickeln nach 6-15 monatiger Behandlung eine Resistenz gegenüber der TKI-Behandlung, was den Erfolg der Therapie limitiert (Brian I. Rini and Atkins 2009). Um dieses Phänomen zu unterdrücken, werden in derzeitig stattfindenden klinischen Studien sequentielle Behandlungspläne erstellt, bei denen die bisher zur Verfügung stehenden Therapieformen möglichst vorteilhaft für den einzelnen Patienten kombiniert werden (I.-C. Cho and Chung 2012; Grünwald et al. 2011; Porta et al. 2011). Dabei ist jedoch mit einer erhöhten Toxizität und bisher unbekanntem Nebenwirkungen zu rechnen. Die Resistenzentwicklung beim NZK wird hauptsächlich mit der Wiederherstellung der Blutversorgung unabhängig vom VEGF in Verbindung gebracht (*Angiogenic switch*). Punktmutationen in den Zielstrukturen der TKI, z. B. in der VEGF-Kinasedomäne, können zu resistenten Klonen innerhalb des Tumors führen. Dabei bliebe die Kinasedomäne funktionsfähig, die Affinität des TKI wäre jedoch deutlich vermindert (O'Hare, Eide, and Deininger 2007; Brian I. Rini and Atkins 2009). Mutationen dieser Art sind am wahrscheinlichsten in den Tumorumgebenden Endothelzellen und damit im VEGFR 2-Gen zu erwarten. Eine Punktmutation als Ursache für die Resistenz gegenüber einem TKI wurde bereits für die chronische myeloide Leukämie (CML) beschrieben. Diese befindet sich in der Bcr-Abl-Kinasedomäne und verursacht die Resistenz gegenüber dem TKI Imatinib (Shah et al. 2002). Mutationen dieser Art können auch gezielt zur Entwicklung von TKIs ausgewählt werden. Patienten mit nicht kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) profitieren nur von einer Behandlung mit Gefitinib, wenn die Tumorzellen eine Mutation im Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) besitzen, was für 75 % der Patienten zutrifft (Mok et al. 2009). Im Falle der TKI-Behandlung des NZK konnte im Mausmodell jedoch nachgewiesen werden, dass die Resistenzentwicklung während der Behandlung reversibel ist (Brian I. Rini and Atkins 2009). Dadurch sind andere

Resistenzmechanismen wahrscheinlicher, wie die Aktivierung von RTK-unabhängigen Signalwegen. Im Mammakarzinom konnte die Resistenz gegen den TKI Lapatinib auf die verstärkte Aktivierung des PI3K/mTOR/p70S6-Signalweg zurückgeführt werden (Vazquez-Martin et al. 2009). Die Resistenz im Melanom gegen den B-Raf-Inhibitor Vemurafenib scheint mit der Reaktivierung der MEK-Signalkaskade und der Hochregulation von N-Ras verbunden zu sein (Nazarian et al. 2010; Trunzer et al. 2013). Weiterhin können eine verstärkte Bindung der TKI an verschiedene sezernierte Proteine oder auch die Expression von Transportproteinen die Wirkung der TKI hemmen (Brian I. Rini and Atkins 2009). Zu nennen ist hier das Transportprotein RLIP76, welches unter Stress verstärkt exprimiert wird. Es ist in der Lage sowohl Sorafenib, als auch Sunitinib aus der Zelle zu transportieren (Singhal et al. 2010). Aber auch die Tumor-infiltrierenden Lymphozyten spielen eine Rolle bei der Resistenzentwicklung. Im Mausmodell für das NZK konnte, nach einer anfänglichen Reduzierung von MDSCs im Tumor und der damit verbundenen Restauration der Aktivität der T-Zellen, ein Anstieg der MDSC-Zellzahlen nachgewiesen werden (Finke et al. 2011). Diese produzieren im hohen Maße Matrix-Metalloprotease 9 (MMP9) und das VEGF homologe Pro-Kinectin 2 (Bv 8). Bv 8 scheint an der Entstehung von Resistenzen gegen VEGF-Antikörper beteiligt zu sein. Hohe MMP9-Konzentrationen sind typisch für Sunitinib-*None-responder* (Santoni et al. 2014). Die Arbeitsgruppe um Casanovas konnte im Mausmodell zudem hohe Konzentrationen von Angiopoetin 2, FGF und Ephrin in Sunitinib-resistenten Tumoren nachweisen (Penticuff and Kyprianou 2015). Dies fördert die Angiogenese unabhängig vom VEGF. Diese Ergebnisse führten zu Entwicklung neuer Substanzen, um den Resistenzmechanismen zu entgehen. Einige sich in klinischen Studien befindliche Substanzen sind in Tabelle 1.2 zusammengefasst. So ist AMG-386 gegen Angiopoetin 1 und 2 (Ang 1 und 2) gerichtet (Brian I. Rini and Atkins 2009). Neue VEGFR-Antagonisten, wie Regurafenib (Conti et al. 2013), und anti VEGF-Antikörper, wie Aflibercept (Posadas and Figlin 2012), sollen das verfügbare Repertoire ergänzen, um in sequentiellen Behandlungsprotokollen zum Einsatz zu kommen. Es gibt jedoch auch Überlegungen, die Angiogenese des Tumors nicht zu unterdrücken, sondern zuzulassen, um Wirkstoffe mit anderen Zielstrukturen des Tumors, besser in diesen transportieren zu können (Wong et al. 2015). Neue Targets, wie die immunmodulatorischen Proteine *Death Receptor 1* (PD1) (Zhi and Kim 2014) und CTL4 (B Escudier et al. 2012) sollen die Inhibierung von T-Zellen aufheben und auf Tumorantigene-sensibilisierte DCs sollen als Impfung die Reifung Tumor-spezifischer T- und NK-Zellen fördern (B Escudier et al. 2012). Die Forschung ist also bestrebt, die Therapien möglichst stark zu „personalisieren“. Über geeignete Testverfahren, wie dem Biomarker-*Screening* sowohl auf genomischer als auch auf proteomischer Ebene, soll die Wahl des verabreichten Medikamentes, sowie dessen Dosierung besser auf den jeweiligen Patienten angepasst werden (Stehle et al. 2013). Therapie-begleitende Biomarker-Screenings können molekulare Veränderungen während der Behandlung monitoren, um so schnell auf Resistenzmechanismen reagieren zu können und die sequentielle Behandlung von Patienten, z.B. mit unterschiedlichen TKI, optimal abzustimmen (Fischer, Gillessen, and Rothermundt 2015)

2 Zielstellung

TKI wurden zur Inhibierung spezifischer Zielstrukturen entwickelt. Welche molekularen Veränderungen jedoch zur angestrebten Wirkung der Tumorbehandlung, wie Inhibierung der Proliferation und Apoptose-Induktion, führen, ist noch weitgehend ungeklärt. Ein genaueres Verständnis der Wirkung der TKI auf die Tumorzelle selbst sowie auf die sie umgebenden Immunzellen, ist für eine individuellere Behandlung von Tumoren jedoch dringend notwendig. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Wirkung von TKI auf NZK-Zellen besser zu verstehen. Dafür sollte sowohl das intra- als auch das extrazelluläre Proteom ausgewählter NZK-Zelllinien nach TKI-Behandlung untersucht werden. Dabei sollten auch mögliche Biomarker zur Überwachung der TKI-Behandlung identifiziert werden.

Die Wirkung von TKI auf die Tumor-infiltrierenden Immunzellen ist bisher noch weitgehend unklar. Dabei ist gerade das NZK sehr stark von Immunzellen infiltriert. In dieser Arbeit sollten die Wirkung der TKI-Behandlung auf Aktivität, Proliferation, Apoptoseinduktion und Gesamtproteom von Immunzellen näher untersucht werden.

Die Wirkdauer der TKI ist auf Grund der Resistenzentwicklung begrenzt. Angiogenese- und Proliferationsfähigkeit der Zellen werden wieder hergestellt. Die genauen molekularen Mechanismen, die ursächlich für diese Entwicklung sind, sind bisher jedoch noch nicht hinreichend geklärt. Zur Aufklärung der mechanistischen Ursachen die im Laufe der TKI-Behandlung zu einer Resistenzentwicklung führen, sollte im Rahmen dieser Arbeit Zelllinien etablieren werden, die eine dauerhafte TKI-Behandlung tolerieren. Das Ziel war es, durch den Vergleich der Proteome von TKI-sensitiven versus adaptierten Zellen Zielstrukturen zu identifizieren, die maßgeblich an der Entwicklung von Resistenzen gegenüber den verschiedenen TKIs beteiligt sein könnten.

3 Material

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Verwendete Zellen

Zellen	Beschreibung
MZ1257RC	humane Nierenzellkarzinomzellen (RCC), etabliert aus primärem Tumorgewebe (Bernhard 1996)
MZ1795RC	humane Nierenzellkarzinomzellen, etabliert aus primärem Tumorgewebe (Bernhard 1996)
MZ2905RC	humane Nierenzellkarzinomzellen, etabliert aus primärem Tumorgewebe (B Seliger et al. 2007)
Cako2	humane Kolonkarzinomzellen (KK), ATCC-Nummer: HTB-37™
HCT116	humane Kolonkarzinomzellen, ATCC-Nummer: CCL-247™
HT29	humane Kolonkarzinomzellen, ATCC-Nummer: HTB-38™
RKO	humane Kolonkarzinomzellen, ATCC-Nummer: CRL-2577™
SW480	humane Kolonkarzinomzellen, ATCC-Nummer: CCL-228™
Jurkat	humane Leukämiezellen (chronische myeloide Leukämie), ATCC-Nummer: TIB-152
PBMC	mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
T-Zellen	isoliert aus PBMC

ATCC...*american tissue culture collection* (ATCC)

T-Zellen wurden mit Anti-CD3 und Anti-CD28 Antikörpern (Maus gegen Human; 1µg/ml; BD Bioscience), Il-2 oder PHA-M stimuliert.

3.1.2 Zellkulturmaterialien

Puffer und Chemikalien	Hersteller
anti-CD3 Antikörper	Becton Dickinson
anti-CD28 Antikörper	Becton Dickinson
Anti-CD3 Antikörper, APC-gekoppelt	Stemcell Technologies, Grenoble, France
DEMEM (mit und ohne Phenolrot)	Gibco [®] by life Technologies, Karlsruhe
Erythrozyten-Lysepuffer	PAA Laboratories GmbH, Coelbe
<i>EasySep™ Human APC Positive Selection Kit</i>	Stemcell Technologies, Grenoble, France
FBS (Hitzeinaktiviert: 45min, 56°C)	Gibco [®] by life Technologies, Karlsruhe
IL-2 (Proleukin)	Chiron, Ratingen
L-Glutamin (200mM in 0,85% NaCl-Lösung)	Lonza, Basel
Lymphozyten-Separationsmedium LSM 1077	PAA Laboratories GmbH, Coelbe
MEM NEAA (100x)	Gibco [®] by life Technologies, Karlsruhe
Natriumpyruvat (100mM)	Gibco [®] by life Technologies, Karlsruhe
PBS (10x)	40 g/l NaCl (Merck, Darmstadt) 1 g/l KCl (Merck, Darmstadt) 1 g/l KH ₂ PO ₄ (Merck, Darmstadt) 7,2 g/l Na ₂ HPO ₄ (Carl Roth GmbH & Co KG Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Phytohemagglutinin (PHA-M) -Phaseolus vulgaris	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RPMI Medium 1640 (mit und ohne Phenolrot)	Gibco [®] by life Technologies, Karlsruhe
Trypanblau	Gibco [®] by life Technologies, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (10x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching

Geräte und Material	Hersteller
Allegra® X-15R <i>centrifuge</i>	Beckman Coulter, Krefeld
CO ₂ - Inkubator	Binder, Tuttlingen
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Solingen
Glaspipette 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Solingen
Glaspipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	TPP® AG, Trasadingen
Leucosep™ 30 ml	Greiner Bio-One GmbH, Solingen
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen
Pasteurpipetten	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co KG Eberstadt
Pipetten	Eppendorf, Wesseling
Pipetboy acu	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Greiner Bio-One GmbH, Solingen
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen
Sterilbank, HERA safe	Hereaus GmbH Sepatech, Osterode
Telaval 3 <i>inverted microscope</i>	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Tischzentrifuge UEC MICRO 14/B	UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH, Planegg
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Solingen
Zellkulturschale Ø 145 x 20 mm (Cell Star)	Greiner Bio-One GmbH, Solingen
TC Zellkulturschale Ø 100 x 20mm	Sarstedt, Nümbrecht

3.1.3 Viabilität (XTT)

Materialien und Chemikalien	Hersteller
<i>Cell Proliferation Kit II</i>	Roche Applied Science, Mannheim
96-well Platten	TPP® AG, Trasadingen

Geräte und Software	Hersteller
ELIZA-reader: <i>micro plate reader</i> MRX-TC	Dynex Technologies, Denkendorf
ELIZA-Reader (Revelation)	Dynex Technologies, Denkendorf
SigmaPlot 12	Systat Software Inc., Erkrath

3.2 FACS-Analysen

3.2.1 Apoptoseanalysen

Materialien und Chemikalien	Hersteller
7-AAD	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Annexin V- Bindepuffer	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
APC Annexin V	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Zellkulturschale Ø 140 mm	Greiner Bio-One GmbH, Solingen

3.2.2 Caspase 3 Analysen

Materialien und Chemikalien	Hersteller
7-AAD	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
<i>FITC active Caspase-3 apoptosis kit</i>	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
<i>FITC rabbit anti-active Caspase-3 antibody</i>	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
<i>rabbit IgG FITC-isotype</i>	Abcam®, Cambridge

3.2.3 Analyse des mitochondrialen Membranpotentials

Materialien und Chemikalien	Hersteller
MitoProbe™ JC-1 Assay Kit	Molecular Probes®, Eugene (OR)

3.2.4 Proliferationsanalysen (CFSE)

Materialien und Chemikalien	Hersteller
<i>Cell Trace™ cell proliferation kit</i>	Molecular Probes® by Life Technologies™, Paisley (UK)

3.2.5 Zellzyklusanalysen

Materialien und Chemikalien	Hersteller
Propidiumiodid	Sigma Aldrich™Chemie GmbH, München
6-well Platten	TPP® AG, Trasadingen
Tween 20	AppliChem GmbH, Darmstadt
Zitronensäure	Sigma Aldrich™Chemie GmbH, München

3.2.6 FACS

Geräte und Materialien	Hersteller
FACS: BD LSRFortessa	BD Bioscience
FACS Röhrchen 5 ml	Sarstedt, Nürnberg
Software: BD FACSDIVA	BD Bioscience

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Proteomanalysen

Chemikalien	Hersteller
Acetonitril	AppliChem GmbH, Darmstadt
Acrylamid/Piperizindiacrylamid (AA/PDA) (40 % w/v)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Agarose, <i>low melting</i>	BioLine GmbH, Luckenwalde
Aluminiumsulfat (14-18)-Hydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma Aldrich™ Chemie GmbH, München
Ammoniumsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ampuwa H ₂ O	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
Bromphenolblau	Sigma Aldrich™ Chemie GmbH, München
BSA (Iyophilisiert)	Sigma Aldrich™ Chemie GmbH, München
Calciumchlorid	Sigma Aldrich™ Chemie GmbH, München
CHAPS	AppliChem GmbH, Darmstadt
Coomassie Brilliantblau G-250	AppliChem GmbH, Darmstadt
DTT	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol	Sigma Aldrich™ Chemie GmbH, München
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Harnstoff	AppliChem GmbH, Darmstadt
<i>Immobiline™ dryStrip</i> pH 3-10 NL, 18 cm	GE Healthcare, München
<i>LMW calibration kit for SDS-electrophoresis</i>	GE Healthcare, München
Lysin	Sigma Aldrich™ Chemie GmbH, München
Methanol	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumthiosulfat	Sigma Aldrich™ Chemie GmbH, München
<i>n</i> -Butanol	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

NDSB-201	Calbiochem [®] (Merk KGaA), Darmstadt
<i>Ortho</i> -Phosphorsäure	Merk KGaA, Darmstadt
Pharmalyte (pH 3-10)	VWR [®] , Darmstadt
<i>Plus one drystrip cover fluid</i>	GE Healthcare, München
<i>Protein assay dye reagent concentrate</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<i>Refractio-2D Labeling Kit</i>	NH DyeAGNOSTICS, Halle
Salzsäure	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
SDS	AppliChem GmbH, Darmstadt
TEMED	AppliChem GmbH, Darmstadt
Thioharnstoff	Sigma Aldrich™ Chemie GmbH, München
Trifluoressigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypsin (<i>sequensing grade modified</i>)	Promega GmbH, Mannheim
α -Cyanohydroxymtsäure	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
2-Jodacetamid	AppliChem GmbH, Darmstadt

Puffer	Inhaltsstoffe
1M Tris/HCl	121,4 g/l Tris HCl pH 8,8
10x SDS Laufpuffer	144 g/l Glycin 30 g/l Tris 10 g/l SDS
9,5 M Harnstoff	570,6 g/l Harnstoff Deionisiert mit AG 501 X8 (D) (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
DIGE-Puffer	7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 30 mM Tris 4 % (w/v) CHAPS HCl bis pH 8,5
Rabilloud (RAB) Puffer (1x)	7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 0,2 M NDSB 201 4 % (w/v)CHAPS weiter auf der nächsten Seite

	1 % (w/v) DTT 0,5 % (v/v) Pharmalyte Bromphenolblau
Trypsin-Puffer	25 mM Ammoniumhydrogencarbonat 0,42 mM Calciumchlorid
Matrix	30 % Acetonitril 0,1 % Trifluoressigsäure gesättigt α -Cyanohydroxyzimtsäure

Geräte und Materialien	Hersteller
Dodeca stainer large	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ettan IPGphor	GE Healthcare, München
Flachbettscanner PowerLook 1100	Umax
Fluoreszenzscanner Image Reader FLA 5000	Fujifilm, Düsseldorf
<i>Gel Saver II-Tips</i> (200 μ l)	Kisker Biotech GmbH & Co KG
Gelkassette DALT 25x20 cm, 1,5 mm	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Halbmikroküvetten	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig
ISO DALT [®] <i>electrophoresis system</i>	Hoefer Inc., Holliston
Mikrozentrifuge Z233 MK-2	HERMLE Labortechnik, Wehingen
Massenspektrometer ultrafleXtreme	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
MTP 384 target plate ground steel	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Netzteil Hoefer EPS 2A200	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Photometer Ultrospec 3300 pro	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Spothunter	Herolab GmbH, München
<i>Strip holder</i> (18 cm)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
<i>Target MTP 384</i>	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Ultraschall-Homogenisator	Sonoplus Bandelin, Berlin

Software	Hersteller
Decodon Delta 2D	Decodon GmbH, Greifswald
Vue Scan	Umax
Sigma Plot 10.0	Systat Software inc., Erkrath
flexAnalysis 3.3.80.0	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Mascot	Matrix Science Ltd, London

3.3.2 Western Blot Analysen

Chemikalien	Hersteller
BCA <i>protein assay kit</i>	Pierce (Thermo Fischer Scientific), Bonn
Benzonase	Novagen, Darmstadt
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pferdeserum	C-C-Pro, Oberdorla
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail	Sigma Aldrich™Chemie GmbH, München
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma Aldrich™Chemie GmbH, München
Protein (MW)-Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>skim milk powder</i>	BD Biosciences, Heidelberg
β-Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tween 20	AppliChem GmbH, Darmstadt

Puffer	Zusammensetzung
10x SDS Laufpuffer	siehe Kapitel 3.3.1
10x TBS-Puffer(pH 7,4)	60,57 g/l Tris HCl bis pH 7,4 12,66 g/l NaCl
TBS-T (Waschpuffer)	1x TBS-Puffer 0,4 % Tween 20
TBS-T (Antikörperverdünnungspuffer)	1x TBS-Puffer 0,1 % Tween 20

4x Probenpuffer	29,07 g/l Tris HCl bis pH 8,0 4 % (w/v) SDS 40 % (v/v) Glycerin 0,004 % (w/v) Bromphenolblau 4 % (v/v) β -Mercaptoethanol
RIPA-Puffer	1 ml NP40 (Nonidet) 100 μ l 10 % (w/v) SDS 0,5 g Natriumdesoxycholat Ad 100 ml PBS Zusätze: Benzonase (1/1000) Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (1/100) Protease-Inhibitor-Cocktail (1/100)
Transferpuffer	80 % 1 x SDS-Laufpuffer 20 % Methanol

Geräte und Materialien	Hersteller
Blot-Kammer Trans-Blot <i>cell</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektrophorese-System <i>Mini Protean 3 Dodeca cell</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Halbmikroküvetten	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig
<i>Luminescent Image Analyzer LAS-3000</i>	Fujifilm, Düsseldorf
Mikrozentrifuge Z233 MK-2	HERMLE Labortechnik, Wehingen
Photometer Ultrospec 3300 pro	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
PVDF <i>blotting membrane</i>	Roche, Mannheim
Stromnetzteil	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<i>Thermocycler F25</i>	Julabo, Allentown
<i>Whatman Papier</i>	Whatman, Dassel

Antikörper	Hersteller	Wirt
β-Aktin	Abcam Cambridge, UK	Maus
<i>active</i> Caspase 3	Cell Signaling Technology [®] , Danvers	Kaninchen
Anti- <i>rabbit</i> -IgG, HRP-gekoppelter Ak	Cell Signaling Technology [®] , Danvers	Ziege
Anti- <i>mouse</i> -IgG, HRP-gekoppelter Ak	Dako Deutschland GmbH, Hamburg	Ziege
<i>Bcl-2 Related Sample Kit</i> BAG1, Beclin, Bcl-xL, Bax	BD Biosciences, Heidelberg	Maus
Bcl-2	Cell Signaling Technology [®] , Danvers	Kaninchen
p-ERK, ERK	Cell Signaling Technology [®] , Danvers	Kaninchen
ERp29	Cell Signaling Technology [®] , Danvers	Kaninchen
GAPDH	Cell Signaling Technology [®] , Danvers	Kaninchen
<i>HSP/Chaperone Antibody Sampler Kit</i> Calnexin, HSF1, HSP40/60/70/90, HSPA5, PDI	Cell Signaling Technology [®] , Danvers	Kaninchen
Mcl-1	Cell Signaling Technology [®] , Danvers	Kaninchen
Stat-3	Cell Signaling Technology [®] , Danvers	Kaninchen
Survivin	Cell Signaling Technology [®] , Danvers	Kaninchen
14-3-3 ζ/δ	Cell Signaling Technology [®] , Danvers	Kaninchen

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 qRT-PCR

Chemikalien	Hersteller
Agarose	BioLine GmbH, Luckenwalde
Ampuwa Wasser	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Ethanol absolut	Sigma Aldrich™Chemie GmbH, München
Ethidiumbromid (1 %)	AppliChem GmbH, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
NukleoSpin [®] RNA II kit	MacheryNagel GmbH & Co. KG, Düren

10 x PCR Rxn <i>buffer</i> (ohne MgCl ₂)	<i>life</i> Technologies™, Darmstadt
10 x DNase I Reaktionspuffer	New England BioLabs® Inc., Frankfurt a.M.
dNTP-Mix (10 mM)	<i>life</i> Technologies™, Darmstadt
β-Aktin <i>Primer</i> (<i>forward</i> , <i>reverse</i>)	<i>life</i> Technologies™, Darmstadt
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/μl)	<i>life</i> Technologies™, Darmstadt
MgCl ₂	<i>life</i> Technologies™, Darmstadt
Platinum® SYBR® <i>green</i> qPCR SuperMix-UDG <i>kit</i>	<i>life</i> Technologies™, Darmstadt
<i>RevertAid™H minus first strand cDNA synthesis kit</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>generuler™ 100 bp plus DNA ladder</i> (0,5 μg/μl)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Geräte und Materialien	Hersteller
Bio Photometer	Eppendorf AG, Hamburg
Biofuge <i>fresco</i>	Hereus GmbH Sepatech, Osterode
Filter Tip	Greiner Bio-One GmbH, Solingen
<i>Labcycler</i>	SensoQuest GmbH, Göttingen
R Corbett <i>life science</i>	Qiagen GmbH, Hilden
Rotor- <i>gene</i> Q	Qiagen GmbH, Hilden
PP-PCR-Gefäß (200 μl)	Greiner Bio-One GmbH, Solingen

Software	Hersteller
Rotor gene 6000 series Software 1.7	Qiagen GmbH, Hilden
SigmaPlot 10	Systat Software Inc, Erkrath

Primer				
Genname		Sequenz: 5'-3': fw... <i>forward</i> Primer, rv... <i>reverse</i> Primer	<i>annealing</i> - Temperatur (°C)	Amplikongröße (bp)
ALAS1	fw	TGAGACAGATGCTAATGGATGC	60	158
	rv	CACCGTAGGGTAATTGATTGCT		
ALDH1A3	fw	GGCAGAGAACTAGGTGAATACGC	60	195
	rv	CTCCAGAAGAATGTGTCCCG		
CCNB1	fw	TACCTATGCTGGTGCCAGTGCC	65	171
	rv	ACAGGTCTTCTTGCAGGGGC		

CCT2	fw	TGCAGGCTATGACAGTGCAGACC	65	191
	rv	CACGCAGAATCACCTCTGCTGC		
CCT5	fw	ATTTGGGACAACCTAAGGATA	50	614
	rv	AGAGATTTTTATCCGGTACTC		
CTSD	fw	TACGTGAAGAATGGTACCTC	50	402
	rv	GACATTCAGGTAGGACAGAG		
DNAJB11	fw	GAATCAAAGTTGTCAAGCAC	50	319
	rv	ACTGACCCTGTTTCAGTAG		
ENO1 TV1	fw	GGCTCACCGGTCCTAT	55	572
	rv	CCATATAGCGAGTCTTATCAT		
ENO1 TV2	fw	TCTGAGTCTCTCTCATTTTTC	50	556
	rv	CCAAACTTAGATTTATTTCTGT		
ERP29	fw	AGCGTCTTGCTGAAAACCTCG	60	239
	rv	ACCTAGGTAGACCCCTTGCC		
HSPA5	fw	CTGGTACTGCTTGATGTATG	50	172
	rv	GTCTTTCACCTTCATAGACCT		
LGALS1	fw	CAACCTGAATCTCAAACCTGG	60	104
	rv	ACAGGTTGTTGCTGTCTTTGC		
POLR2B	fw	GCATTGTGGCAACTCTACCATA	60	178
	rv	GCAACATTCTGTTCTTGGATGA		
PPIA	fw	CCAAGACTGAGTGGTTGGATG	60	192
	rv	CAGAAGGAATGATCTGGTGG		
SPARC	fw	ACAACAACCTTCTGACTGAG	50	251
	rv	GATCCTTGTCGATATCCTT		
TXNRD1	fw	AGAGGCTCTATGCAGGTTCC	60	188
	rv	ATCTCTTGACGGAATCGTCC		
YWHAZ	fw	CAAGTATTGAACAAAAGACG	50	317
	rv	CAGTCTGATAGGATGTGTTG		

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Zellkultivierung

Alle Zellen wurden unter normoxischen Bedingungen in einem CO₂-Inkubator bei einem CO₂-Partialdruck von 5 % bei 37 °C unter sterilen Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden in 175 cm² Kulturflaschen (RCC, KK) bzw. 75 cm² Kulturflaschen (Jurkat, PBMCs und T-Zellen) in ihren jeweiligen Kulturmedien (RCC, KK: DEMEM; Jurkat, PBMCs und T-Zellen: RPMI) angezogen. Die Kulturmedien wurden mit 10 % FKS, 1 % L-Glutamin, 1 % Natriumpyruvat, 1 % MEM NEAA und 1 % Penicillin/Streptomycin komplementiert. Die Zellen wurden passagiert, wenn sie eine 90 % ige Konfluenz erreicht hatten. Dafür wurde das Kulturmedium steril abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Die Verdünnung in frisches Zellkulturmedium erfolgte nach Bedarf.

4.1.1.1 Isolierung der PBMCs und T-Zellen

PBMCs wurden aus gesundem Spenderblut (*Buffy coats*, Blutspende des Universitätsklinikums Halle/Saale) mit Hilfe von Leukosep®-Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Solingen) und dem Lymphozyten-Separationsmedium LSM 1077 (PAA Laboratories GmbH, Coelbe) nach Herstellerangaben isoliert. Die Zellen wurden mittels Erythrozyten-Lysepuffer von Verunreinigungen mit Erythrozyten befreit und Monozyten durch Absetzen am Kulturschalenboden entfernt. Die Isolierung von T-Zellen aus den PBMC erfolgte durch die Markierung mit Allophycocyanin (APC)-konjugierten anti-CD3 Antikörpern und nachfolgender Selektion unter Verwendung des *EasySep™ Human APC Positive Selection Kit* nach dem Protokoll des Herstellers (Stemcell Technologies, Grenoble, France). Die Kultivierung bzw. Aktivierung der Immunzellen erfolgte in Anwesenheit von IL-2 (PROLEUKIN, Chiron, 100 U ml⁻¹) und anti-OKT3/anti-CD28 Antikörpern (*mouse anti-human*, je 1 µg ml⁻¹, Becton Dickinson) oder PHA-M (4 µg ml⁻¹, Sigma Aldrich).

4.1.1.2 Zellkultivierung für Proteom-Analysen

Adhärente Zelllinien wurden mit einer Zelldichte von 1 × 10⁶ Zellen/Platte in 3-4 (Ø 145 mm) Kulturschalen ausgesät und nach Erreichen der Adhärenz mit dem entsprechenden TKI (IC₅₀ Wert) bzw. DMSO behandelt. Die nicht-adhärenten Zelllinien wurden mit einer Zelldichte von 1 × 10⁷ Zellen/Flasche in 3-4 75-cm²-Kulturflaschen ausgesät. Jurkat-Zellen wurden durch Zugabe von 4 µg/ml PHA-M und 100 Units/ml Il-2 stimuliert. Die Behandlung mit TKI erfolgte unmittelbar mit einer Konzentration gemäß dem ermittelten IC₅₀-Wert. Die Zellen wurden in einem CO₂-Inkubator bei einem CO₂-Partialdruck von 5 % bei 37 °C unter sterilen Bedingungen 72 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die erhaltenen Zellpellets dreimal mit PBS gewaschen, um die im FKS enthaltenen Proteine zu entfernen. Die sauberen Pellets wurden bei -80 °C bis zu Weiterverarbeitung gelagert.

4.1.1.3 Kultivierung für Western Blot Analysen

Adhärente Zelllinien wurden mit einer Zelldichte von 3×10^5 Zellen/ml in 3-4 Kulturschalen (\emptyset 100 mm) ausgesät und nach Erreichen der Adhärenz mit unterschiedlichen TKI-Konzentrationen behandelt. Die nicht-adhären Zellen wurden mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml in 3-4 75 cm² Kulturflaschen ausgesät. T-Zellen wurden durch Zugabe von 4 µg/ml PHA-M und 100 Units/ml Il-2 stimuliert und unmittelbar mit verschiedenen TKI-Konzentrationen inkubiert. Die Zellen wurden in einem CO₂-Inkubator bei einem CO₂-Partialdruck von 5 % bei 37 °C unter sterilen Bedingungen 72 h kultiviert.

4.1.2 **XTT-Analysen**

Für die Untersuchung der Zellviabilität wurden 3×10^3 Zellen/*well* in einer 96-*well*-Platte über Nacht kultiviert. Nach Zugabe des zu untersuchenden TKI (RCC: 0-100 µM; Jurkat/PBMC: 0-20 µM) wurden die Zellen 48 h bzw. 72 h inkubiert und anschließend mit 50 µl XTT-Reagenz pro *well* versetzt. Gemessen wurde der Umsatz von Na-3,3'-[1-(phenylamino)-carbonyl-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)-benzol-sulfonäurehydrat (XTT) zu Formazan durch das Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System der Mitochondrien metabolisch aktiver Zellen (Scudiero et al. 1988). Nach 4 h wurde der Farbumschlag (orange) mit dem ELISA-Reader MRX TC II bei 490 nm gemessen. Die Datenauswertung erfolgte mittels SigmaPlot 12 unter Anwendung folgender Formel.

Formel 4.1 Viabilitäts-Berechnung

$f(x)$ = Viabilität (%), χ = [TKI](µM), Hillslope = Anstieg der Kurve

$$f(x) = \min Viabilität + \left((\max Viabilität - \min Viabilität) / \left(1 + \left(\frac{x}{IC_{50}} \right)^{-Hillslope} \right) \right)$$

4.2 **Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist ein Laser-gesteuertes Analyseverfahren, bei dem fluoreszenzmarkierte Zellen einzeln in einem laminaren Probenstrom einen Laser (*light amplification by stimulated emission of radiation*) passieren. Die gestreute und reflektierte Strahlung des monochromatischen Lichts lässt Aussagen zur Zellgröße (*forward scatter*, FSC) und Granularität (*sideward scatter*, SSC) zu. Durch das vom verwendeten fluoreszenzmarkierten Antikörper emittierte Licht lassen sich zusätzliche Aussagen über die Spezifität der Zelle ableiten.

4.2.1 **Analysen zur Apoptose**

Zur Untersuchung der TKI-vermittelten Apoptose-Induktion wurden die Zellen in 6-*well*-Mikrotiterplatten ausplattiert und 72 h in einem CO₂-Inkubator bei einem CO₂-Partialdruck von 5 % bei 37 °C unter sterilen Bedingungen kultiviert. Zur Erfassung der bereits abgelösten und nekrotischen Zellen bei adhären wachsenden Zellen wurde zunächst der Zellkulturüberstand zentrifugiert (5 min, 500 x g, RT) und die vorhandenen Zellpellets in 15-ml-Reaktionsgefäßen gesammelt. Anschließend wurden die adhären Zellen gewaschen, trypsiniert und geerntet und in die 15-ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden pelletiert (5 min, 500 x g, RT), mit 5 ml kaltem PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und in 1 ml kaltem PBS suspendiert. 200 µl

der Zellsuspension wurden in 5 ml FACS-Röhrchen überführt und erneut dreimal mit kaltem PBS gewaschen, bevor sie pelletiert und in 100 µl Annexin V-Bindepuffer aufgenommen wurden. Zur Unterscheidung der früh-apoptotischen von den nekrotischen bzw. spät-apoptotischen Zellen wurde eine Doppelfärbung mit je 5 µl Allophycocyanin(APC)-konjugiertem Annexin V und 7-AAD durchgeführt. Die Suspension wurde 15 min bei RT lichtgeschützt inkubiert, anschließend mit 1 ml Annexin V-Bindepuffer gewaschen und die markierten Zellen erneut pelletiert. Die Zellen wurden unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Analyse in 800 µl Annexin V-Bindepuffer aufgenommen. Annexin V bindet Ca^{2+} -abhängig an das Membranphospholipid Phosphatidylserin, das in früh-apoptotischen Zellen an die Zelloberfläche transloziert vorliegt. 7-AAD hingegen gelangt erst nach Schädigung der Zellmembran, während der Spätphase der Apoptose bzw. in nekrotischen Zellen, in die Zelle und interkaliert dort in doppelsträngige DNA (van Engeland et al. 1996).

4.2.2 Analyse des mitochondrialen Membranpotentials

Die Analyse des mitochondrialen Membranpotentials in Ab- und Anwesenheit der TKI erfolgte durchflusszytometrisch unter Verwendung des Farbstoffs *J-aggregate forming lipophilic cationic fluorescence dye* JC-1 nach dem Protokoll des Herstellers (Molecular Probes®, Eugene (OR)). Dafür wurden 3×10^5 Jurkat-Zellen bzw. 1×10^6 T-Zellen aus PBMCs 72 h mit 0-10 µM Sunitinib, Sorafenib bzw. Axitinib behandelt und anschließend untersucht. In gesunden Zellen formt JC-1 ein Aggregat (rot). Bricht das Membranpotential zusammen, kommt es zu einer Grün-Verschiebung, da JC-1 in seine monomere Form (grün) übergeht.

4.2.3 Caspase3-Assay

Zur Untersuchung der TKI-vermittelten Apoptose wurden Zellen für 24 h im CO_2 -Inkubator bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die zu testenden TKI-Konzentrationen zugegeben und weitere 48 h inkubiert. Zur Erfassung der bereits abgelösten und nekrotischen Zellen bei adhären Zellen wurde zunächst der Zellkulturüberstand zentrifugiert (5 min, 500 × g, RT) und die vorhandenen Pellets gesammelt. Die adhären Zellen wurden gewaschen, trypsinisiert, in 5 ml Kulturmedium aufgenommen und mit den vom Zellkulturüberstand gewonnenen Pellets vereinigt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 2 ml PBS resuspendiert, in ein 5 ml FACS-Röhrchen überführt und erneut pelletiert (5 min, 500 × g, RT). Es folgte die Markierung mit FITC-konjugiertem anti-*cleaved* Caspase-3-Antikörpern nach Herstellerangaben (*FITC active caspase-3 apoptosis kit*, BD) sowie die Analyse am Durchflusszytometer.

4.2.4 CFSE-Färbung zur Bestimmung der Zellproliferation

Die Bestimmung der Proliferationsrate der Zellen erfolgte durch Markierung mit Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE). Das Fluorophor bindet kovalent an sekundäre Aminogruppen intrazellulärer Proteine und wird bei der Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen aufgeteilt (Lyons and Parish 1994). 4×10^5 Zellen wurden in 10 ml vorgewärmtem PBS/FKS (37 °C, 0,3 % FKS) unter Zugabe von 0,5 µM CFSE suspendiert und 15 min bei 37 °C im CO_2 -Inkubator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (5 min, 500 × g, RT) und mit 10 ml PBS/FKS (0,3 %) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 10 ml vorgewärmtem Kulturmedium aufgenommen und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die CFSE-markierten Zellen in 6-well Platten mit einer Zelldichte von 2×10^4 Zellen/well ausplattiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit 4 ml PBS gewaschen und mit frischem Kulturmedium versehen. Die Analyse erfolgte nach definierten Zeitabständen (0 h, 24 h, 48 h, 72 h). Das Kulturmedium wurde entfernt, die Zellen mit PBS

gewaschen und adhärenente Zellen trypsiniert. Die Zellen wurden dann in 1 ml PBS/FKS (0,3 %) aufgenommen, in ein FACS-Röhrchen überführt und durchflusszytometrisch analysiert.

4.2.5 Zellzyklusanalysen

Je nach Zellzyklusphase (G0, S, G2M) variiert der DNA-Gehalt im Zellkern, was mittels 7-AAD-Markierung an präparierten Zellkernen verfolgt werden kann.

Es wurden 3×10^5 Jurkat-Zellen/*well* in 6-*well* Platten eingesät, die TKI-Behandlung gestartet (je 5 und 10 μ M Sunitinib, Sorafenib, Axitinib und DMSO als Kontrolle) und nach definierten Zeitpunkten (0 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h) die Zellen geerntet (3 min, $400 \times g$, RT) und in 10 ml PBS/FKS (2%) aufgenommen. Die Zellen wurden pelletiert (3 min, $400 \times g$, RT), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 ml Zitronensäure/Tween 20-Lösung (2,1 g Zitronensäure, 0,5 ml Tween 20, ad 100 ml H₂O) resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde 20 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde unter moderatem Schütteln tropfenweise mit 2 ml eiskaltem Ethanol (70 %) versetzt und für mindestens 24 h bei 4 °C inkubiert. Die präparierten Zellkerne wurden anschließend in ein 5 ml FACS-Röhrchen überführt und pelletiert (3 min, $500 \times g$, 4 °C). Die Zellkerne wurden zweimal mit je 2 ml PBS/Tween 20 (0,5 %) gewaschen und anschließend in 300 μ l RNase-Lösung (1 mg/ml) resuspendiert. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Färbung der DNA mit 7-AAD (0,05 μ g/ μ l) und die durchflusszytometrische Analyse (Stehle et al. 2013).

4.3 2D-PAGE-basierte Proteom-Analysen

4.3.1 Probenaufarbeitung

Die Proteine wurden aus den bei -80°C gelagerten Zellpellets isoliert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Resuspension der Zellpellets unter Verwendung von DIGE-Puffer (Volumen an Pellet-Größe angepasst) und anschließender Ultraschallbehandlung (5 \times 5 Sek., 70 % Leistung, auf Eis). Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (90 min, $11.000 \times g$, 4 °C) abgetrennt und der lösliche Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

4.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bradford-Tests (Bradford 1976) bestimmt. Zunächst wurden Eichlösungen mit definierten BSA-Konzentrationen (0-50 μ g/ μ l) hergestellt. Jeweils 10 μ l der Eichlösungen wurden mit 10 μ l HCL (0,1 M) angesäuert und mit 85 μ l H₂O verdünnt. 100 μ l des Ansatzes wurden anschließend mit 3,5 ml Bradfordreagenz (1:3 Verdünnung) in einem 5 ml-Reaktionsgefäß gemischt und nach 10 min die Absorption bei 595 nm gemessen. Für die Untersuchung der Proteinproben wurden 3 μ l Probe mit 7 μ l DIGE-Puffer verdünnt und anschließend wie oben beschrieben verfahren.

4.3.3 Differentielle Gelelektrophorese

Zur Detektion der nach TKI-Behandlung differenziell synthetisierten Proteine, wurde die DIGE-Technologie (*Minimal-Labeling*) (Unlu, Morgan, and Minden 1997) verwendet. Diese Methode zeichnet sich dadurch aus, dass zur Analyse nur geringe Mengen an Protein benötigt werden (ca. 25 μ g/Probe/Gel). Durch die Möglichkeit, 3 diskrete Farbstoffe zur Markierung verschiedener Proben zu verwenden (G-Dye 100, 200 und 300), reduziert sich die Zahl der benötigten Acrylamid-Gele. Die beiden zu vergleichenden Proben werden dabei in einem Gel aufgetrennt. Zusätzlich wird eine dritte Probe, die sich aus gleichen Teilen der zu vergleichenden Proben zusammensetzt, im selben Gel mitgeführt und als interner Proteinstandard verwendet. Die

Fluoreszenzmarkierung erfolgte unter Verwendung des *Refraction-2D™ Labeling Kits* nach dem Protokoll des Herstellers (NH DyeAGNOSTICS GmbH, Halle). Die Anregungs- und Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

4.1 G-Dye Anregungs- und Emissionsspektren

G-Dye	Max. Anregung [nm]	Max. Emission [nm]
G-Dye 100	498	524
G-Dye 200	554	575
G-Dye 300	648	663

Die Bindung der Farbstoffe erfolgt kovalent an die N-Hydroxysuccinimidyl (NHS)- Gruppe der Lysin-Reste bei einem pH-Wert von 8,5. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Minimalmarkierung werden nur 3 % der verfügbaren Proteine und dort nur jeweils ein Lysin-Rest markiert, wodurch das Molekulargewicht der Proteine nahezu unverändert bleibt. Leichte Verschiebungen im Gelbild aufgrund der Fluoreszenzmarkierung wurden durch die computergestützte Auswertung der Gele ausgeglichen. Der mitgeführte interne Standard dient zur Normalisierung der Fluoreszenzintensitäten der beiden zu untersuchenden Proben.

4.3.3.1 Fluoreszenzmarkierung

Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte nach Herstellerangaben (NH DyeAGNOSTICS GmbH, Halle) mit leichter Abwandlung. Zur Reduzierung des Probenverbrauches wurden zur Markierung jeweils 25 µg Protein in einem Endvolumen von 20 µl eingesetzt. Im Folgenden werden Zusammensetzung und Ablauf der Fluoreszenzmarkierung für jeweils ein Gel (ein biologisches Replikat) beschrieben. Je 20 µl Proteinlösung (25 µg Protein) wurden mit 1 µl des jeweiligen Farbstoffes (Tabelle 4.2) gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Der nichtgebundene Farbstoff wurde durch Zugabe von 1 µl Lysin (10 mM) abgefangen und die Reaktion so gestoppt. Die drei fluoreszenzmarkierten Proben wurden vereint (60 µl) und zur Reduktion der Disulfid-Brücken mit 60 µl 2 × RAB-Puffer versetzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 1 × RAB-Puffer auf ein Endvolumen von 350 µl aufgefüllt.

Tabelle 4.2 G-Dye Markierung

G-Dye	Probe
G-Dye 100	Interner Standard (IPS)- beide Proben im Verhältnis 1:1 gemischt
G-Dye 200	Unbehandelte Probe (DMSO)
G-Dye 300	TKI-behandelte Probe

Für die präparativen Gele wurde eine deutlich höhere Proteinmenge benötigt. Es wurden je nach Verfügbarkeit 1-3 Gele mit einer Proteinmenge von 550 µg/Gel pro Versuchsbedingung (unbehandelt und behandelt) angefertigt. Das jeweils erforderliche Probenvolumen (in DIGE-Puffer) wurde mit dem gleichen Volumen 2 × RAB-Puffer versetzt und anschließend ebenfalls auf ein Endvolumen von 350 µl mit 1 × RAB-Puffer aufgefüllt. Die Proben wurden bis zur anschließenden isoelektrischen Fokussierung auf Eis gelagert.

4.3.3.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Bei der isoelektrischen Fokussierung handelt es sich um ein Verfahren, bei dem die Proteine in Abhängigkeit ihres spezifischen isoelektrischen Punktes (pI) entlang eines pH-Gradienten aufgetrennt werden, wobei das Proteingemisch unter denaturierenden Bedingungen auf eine Gelmatrix aufgetragen wird. Verwendet wurden vorgefertigte IPG-Streifen (*Immobiline™*

dryStrip, GE Healthcare) mit einem pH-Gradienten von 3-10. Durch das Anlegen einer Spannung migrieren die Proteine im elektrischen Feld in den pH-Bereich, in dem ihre Nettoladung null beträgt. Die Proteinlösungen (analytische und präparative) wurden in Fokussierungsschiffchen vorgelegt, die IPG-Streifen mit der Gel-Seite in die Lösung eingebettet und anschließend mit 450 µl *drystrip cover fluid* (GE Healthcare) überschichtet. Vor der eigentlichen Fokussierung wurde die Gelmatrix in der Proteinlösung rehydriert. Die einzelnen Schritte des verwendeten Fokussierungsprogramms, sind in Tabelle 4.3 aufgeführt.

Tabelle 4.3 Fokussierungsprogramm

Schritt	Zeit [h]	Spannung [V]
Rehydrierung	2	0
Step 1	10	30
Step 2	1	500
Step 3	1	1000
Step 4	1	5000
Step 5	5	8000

Die fertig fokussierten Streifen (mindestens 38500 Vhrs) wurden entweder direkt weiter verarbeitet oder bei -20 °C dunkel gelagert.

4.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die Trennung der Proteine in der zweiten Dimension entsprechend des Molekulargewichtes erfolgte mittels SDS-PAGE. Zur Überdeckung der Eigenladung der Proteine wurde Natriumdodecylsulfat (SDS) verwendet. Durch die Sulfonsäure-Gruppen werden die Proteine stark negativ geladen, dissoziieren in ihre Untereinheiten und entfalten sich vollständig, wodurch sie unabhängig von ihrer räumlichen Struktur, Aminosäure-Zusammensetzung und ihrem pI im elektrischen Feld migrieren. Die Laufgeschwindigkeit ist damit ausschließlich vom Molekulargewicht der Proteine abhängig (Laemmli 1970). Zur Durchführung der PAGE wurden selbstgefertigte 13 %-ige Polyacrylamidgele verwendet. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 4.4 aufgeführt. Die Gele wurden in einer ISO DALT Gelgießkammer gegossen. Um eine möglichst plane Oberfläche zu erhalten, wurden die Gele mit 2 ml Tris-gesättigtem Butanol überschichtet. Die Polymerisierung erfolgte für mind. 5h.

Tabelle 4.4 13 %-ige Polyacrylamidgele (Ansatz für 12 Gele)

Chemikalien	Volumen [ml]
AA/PDA (39:1 Mix)	520
1 M Tris/HCl (pH 8,8)	600
Glycerin	64
1 M Natriumthiosulfat	8
Bidestilliertes H ₂ O	392
10 % APS	16
TEMED	0,8

Vor der Beladung der Gele mit den Fokussierungstreifen erfolgte die Äquilibration dieser in zwei Schritten. Die Zusammensetzung der Puffer ist in Tabelle 4.5 aufgeführt. Im ersten Äquilibrationsschritt werden die Disulfid-Brücken der Proteine mit Hilfe von Dithiothreitol (DTT) vollständig reduziert. Im nachfolgenden, zweiten Schritt werden die reduzierten SH-Gruppen durch Iodacetamid blockiert, um eine erneute Bildung der Disulfid-Brücken zu verhindern. Die Äquilibrationsschritte erfolgten für je 15 min bei RT. Anschließend wurden die Fokussierungstreifen in 1 × SDS Laufpuffer gelagert und schnellst möglich auf die Geloberfläche aufgebracht.

Tabelle 4.5 Zusammensetzung Äquilibrationpuffer (Ansatz für 12 Gele)

Chemikalien	Zusammensetzung
9,5 M Harnstoff	189 ml
1 M Tris/HCl (pH 8,8)	15 ml
Glycerin	90 ml
Bidestilliertes H ₂ O	Ad 300 ml
SDS	6 g
DTT (Puffer 1)	2,25 g / 150 ml
Iodacetamid (Puffer 2)	7,2 g / 150 ml

Die Fokussierungstreifen wurden Luftblasen-frei auf die Geloberfläche aufgebracht und durch eine 1 %-ige *low melting* Agarose-Schicht fixiert. Als Größenstandard diente das *LMW calibration kit* (GE Healthcare). 10 µl des Größenstandards wurden auf einen Papierstreifen geladen und an die saure Seite des Fokussierungstreifens positioniert. Nach Polymerisierung der Agarose wurden die Gele in die mit 1 x SDS Laufpuffer gefüllte ISO DALT Laufkammer (Bio-Rad) eingesetzt. Der Übertritt der Proteine ins Gel erfolgte bei einer Spannung von 20 V für 4 h. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 100 V und 10 °C bis 1800 Vhrs erreicht wurden (ü. N.). Die Fluoreszenz-markierten Proteine konnten direkt mit Hilfe eines Fluoreszenzscanners (FLA 5000 von Fuji-Film, Düsseldorf) visualisiert werden.

4.3.4.1 Coomassie-Färbemethoden

Zur Färbung der präparativen Gele wurden je nach Proteinmenge zwei verschiedene Färbemethoden verwendet. Die kolloidale Coomassie-Färbung nach Neuhoff (Neuhoff et al. 1988) wurde bei Proteinkonzentrationen zwischen 400 und 500 µg verwendet. Die Zusammensetzung der Färbelösung ist in Tabelle 4.6 aufgeführt. Dabei ist die Reihenfolge, mit der die Chemikalien zugegeben werden essentiell für die Effektivität der Färbung. Die Färbung erfolgte für mind. 18 h. Entfärbt wurde mit H₂O.

Tabelle 4.6 Zusammensetzung kolloidale Coomassie-Färbelösung nach Neuhoff (5 l)

Chemikalien	Zusammensetzung
Ammoniumsulfat	500 g
H ₂ O	2,5 l
Ortho-Phosphorsäure	118 ml
Coomassie Brilliant Blue G250	5 g
H ₂ O	ad 4 l
Methanol	1 l

Bei Proteinkonzentrationen von unter 300 µg pro Gel wurde eine Variante der oben beschriebenen Färbemethode verwendet, bei der noch Proteinkonzentrationen von 20-50 ng

pro *Spot* detektiert werden können (Candiano et al. 2004). Die Zusammensetzung der Färbelösung ist in Tabelle 4.7 dargestellt. Auch hier ist die Reihenfolge zu beachten. Erst wenn sich das gelöste Aluminiumsulfat mit dem Ethanol homogenisiert hat, kann der Farbstoff und anschließend die Säure zugegeben werden. Die Sättigung wird bei dieser Färbung bereits nach 3 h erreicht und sollte nicht überschritten werden. Die Entfärbung erfolgte mittels Entfärbelösung (10 % Ethanol, 2 % Ortho-Phosphorsäure) und H₂O, bis ein deutliches *Spot*-Muster erkennbar war.

Tabelle 4.7 Zusammensetzung kolloidale Coomassie-Färbelösung nach Kang (5 l)

Chemikalien	Zusammensetzung
Aluminiumsulfat	250 g
H ₂ O	Ad 4,5 l
Ethanol	500 ml
Coomassie Brilliant Blue G250	1 g
Ortho-Phosphorsäure	118 ml

Beide Färbemethoden erfolgten unter Verwendung eines Dodeca-Färberoboters (Bio-Rad-München) und ermöglichten eine gleichmäßige Farbintensität, sowie eine reversible Fixierung der Proteine im Gel.

4.3.4.2 Gel-Dokumentation

Die präparativen Gele wurden mit Hilfe eines Flachbettscanners (PowerLook 1100) bei einer Auflösung von 400dpi im Durchlichtmodus (*Vue Scan Software*) digitalisiert und als TIFF-Datei gespeichert. Die Gele wurden anschließend in Folien (Leitz) eingeschweißt und bis zur weiteren Bearbeitung bei 4 °C gelagert.

Das Auslesen der Fluoreszenz-markierten Gele erfolgte am Fluoreszenzscanner (*Image Reader FLA 5000*) bei einer Auflösung von 100 µm. Die Laser wurden entsprechend der Anregungswellenlänge des verwendeten Farbstoffes gewählt und sind in Tabelle 4.8 aufgelistet. Die Laserstärke wurde so eingestellt, dass die Emission des stärksten Proteinspots noch knapp unterhalb des Sättigungsbereiches lag (750-800V). Um keine Informationen durch Datenkomprimierung zu verlieren, wurden die Bilder als Rohdaten (inf Datei) gespeichert, mit der maximalen Anzahl von Graustufen (16 Bit).

Tabelle 4.8 Gegenüberstellung von Laser und Fluoreszenzfarbstoff

Fluoreszenzfarbstoff	Laser
G100	LPB 473 nm
G200	LPG 532 nm
G300	Cy5 Doppelfilter 635 nm

4.3.4.3 Auswertung der Proteinspotmuster im Gel

Die Auswertung der Proteinspotmuster erfolgte unter Verwendung der Delta 2D Software (Decodon, Greifswald) nach dem Protokoll des Herstellers. Die quantitative Auswertung von 2D-Gele orientiert sich dabei an dem *consensus spot pattern*-Algorithmus (Berth et al. 2007; Luhn et al. 2003). Als Auswahlkriterium für statistisch relevante Regulationsunterschiede wurde für jeden *Spot* das relative Verhältnis der normierten Intensität gebildet, die Standardabweichung berechnet und ein studentischer t-Test durchgeführt. Als reguliert gilt ein Protein, wenn es um

den Faktor 2 hoch- bzw. herunterreguliert vorliegt und eine Irrtumswahrscheinlichkeit (p-Wert) von $p \leq 0,05$ aufweist.

4.3.5 Massenspektrometrische Methoden

Die Identifizierung der Proteine erfolgte mittels *Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight*-Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS). Diese Analyse erfordert das Mischen der Probe mit einer Matrix (aromatische Verbindung) (Hillenkamp and Karas 1990). Bei der Co-Kristallisation beider Substanzen wird der Analyt in die Matrixkristalle eingebettet. In der evakuierten Ionenquelle des Massenspektrometers wird die Probe mit einem kurzwelligen Laser beschossen, wobei Matrix- und Probenmoleküle in die Gasphase übergehen. Dabei treten Protonen von der Matrix auf den Analyt über. Die ionisierten Analytmoleküle werden durch das Anlegen von Hochspannung beschleunigt und anschließend im Flugzeitanalysator nach dem Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) aufgeschlüsselt. Zur exakten Bestimmung der Masse des Analyten erfolgt ein Abgleich mit Kalibrierungssubstanzen. Zur Identifizierung der differentiell exprimierten Proteine wurde die Methode des *Peptide mass fingerprints* (PMF) angewendet. Die ermittelten PMFs wurden mit virtuell erzeugten PMFs der *MartixScience* Datenbank abgeglichen.

4.3.5.1 In-Gel-Verdau der differentiell exprimierten Proteine

Zur Identifizierung der differentiell exprimierten Proteine wurden die entsprechenden *Spots* mit Hilfe eines Pickroboters (Spathunter, Herolab) aus den präparativen Gelen ausgestanzt. Anschließend wurden die Gelstücke in zwei Schritten mit 50 % (v/v) Acetonitril entfärbt (16+2 Stunden) und mit 100 % Acetonitril (ebenfalls in zwei Schritten) dehydriert. Nach der Trocknung der Gelstücke wurden 3 μ l/*Spot* Trypsinlösung (Promega GmbH, Mannheim; gelöst in 1,2 ml 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat und 5 μ l 100 mM CaCl_2) auf die *Spots* pipettiert. Nach dem Quellen der Gelstückchen für 2 h auf Eis, erfolgte der tryptische Verdau bei 37 °C für min. 18 h. Bis zur massenspektrometrischen Untersuchung wurden die Gelstücke bei -20 °C gelagert.

4.3.5.2 Massenspektrometrie (MALDI-TOLF MS)

Die tryptisch verdauten Proteine wurden im Ultraschallbad (SONOPLUS Bandelin, Berlin) für 15 min beschallt und anschließend zentrifugiert (10 min, 11.000 \times g, RT). Die Proben wurden 1:1 mit der Matrix (gesättigte α -Cyanohydroxymizsäure in 30 % (w/v) Acetonitril, 1 % (w/v) Trifluoressigsäure) gemischt und jeweils 1 μ l auf das MALDI *target* (MTP 384 *target plate ground steel*) aufgetragen. Nach der vollständigen Trocknung erfolgte die MALDI-TOF-MS unter Verwendung des *ultrafleXtreme™* Massenspektrometers (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) im positiven Reflektor- Modus bei einer Beschleunigungsspannung von 25 kV. Zur Auswertung wurden die Spektren in das Analyseprogramm flexAnalysis (3.3.80.0) geladen. Die Detektion der einzelnen *Peaks* erfolgte unter Verwendung der Standardeinstellungen nach der Entfernung bekannter Hintergrund-*Peaks*. Die PMF-Daten wurden in Excel übertragen und mit Hilfe des *Mascot* Programms (<http://www.matrixscience.com>) unter Verwendung der folgenden Parameter ausgewertet: (i) Homo sapiens; (ii) fixierte Modifizierung: Carbamidomethylierung von Cysteinresten; (iii) Spaltungsenzym: Trypsin; (vi) maximal eine versäumte Spaltung erlaubt bei einer Massentoleranz (monoisotopisch) von ± 50.0 ppm. Die eigentliche Identifizierung der regulierten Proteine basierte auf der globalen Sequenzabdeckung der abgeglichenen Peptidfragmente. Nur Proben mit einem MASCOT *Score* von über 57 gelten als signifikant.

4.4 Validierung differenziell exprimierter Proteine mittels Immunoblot

Die Zellen wurden nach Möglichkeit direkt von der Platte, bzw. nach Pelletierung, in RIPA-Puffer aufgenommen und 1 h auf Eis inkubiert. Das Zelllysate wurde anschließend für 45 min zentrifugiert (11000 × g, 4 °C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

4.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Assay

Die Proteinkonzentration wurde unter Verwendung des *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, Bonn) nach dem Protokoll des Herstellers in einer 3-fach Bestimmung ermittelt.

4.4.2 1D-SDS-PAGE

Die Gelelektrophorese erfolgte nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970) unter reduzierenden Bedingungen. Es wurden 50 µg Protein mit einem Drittel 4 × Probenpuffer gemischt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung mittels SDS-PAGE unter Verwendung selbstgefertigter Gele. Die Gel-Zusammensetzung ist in Tabelle 4.9 aufgeführt. Die Proben wurden mit einer Spannung von 50 V vom Sammelgel in das Trenngel überführt. Die Auftrennung erfolgte anschließend bei 10 °C und 120 V. Als Molekularmassenstandard diente der *prestained Marker* von Fermentas (5 µl).

Tabelle 4.9 Zusammensetzung Polyacrylamidgel

Reagenz	Trenngel (12 %)	Sammelgel (5 %)
H ₂ O	4,3 ml	2,4 ml
Acrylamid (40 %)	3 ml	0,5 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	-	1 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	2,5 ml	-
10 % (w/v) APS	100 µl	40 µl
TEMED	4 µl	6 µl
Isopropanol	zum Überschichten	

4.4.3 Immunoblot

Unmittelbar nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) (Towbin, Staehelin, und Gordon 1979). Die PVDF-Membran wurde in Methanol aktiviert und anschließend für 20 min in Transferpuffer (80 % 1 x SDS-Laufpuffer, 20 % Methanol) äquilibriert. Der schematische Aufbau des *Blots* ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Der Transfer erfolgte in einer Tank-*Blot*-Apparatur (Biorad) bei 100 mA für 18 h.

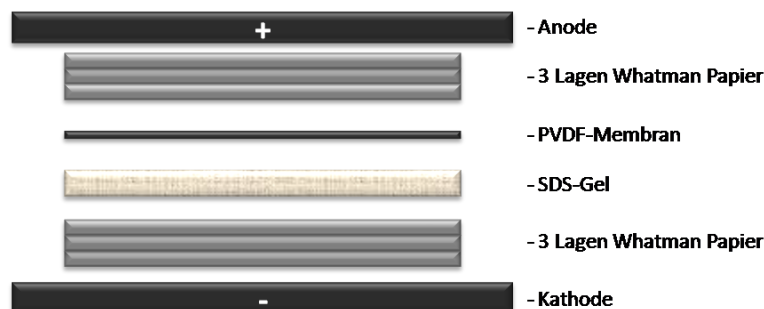


Abbildung 4.1 schematischer Aufbau eines *Western Blot*

4.4.4 Immundetektion

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurden unspezifische Bindungsstellen zunächst mit Blockierungspuffer (0,4 % Tween 20, 10 % (w/v) Milchpulver, 10 % Pferdeserum) für 3 h blockiert. Die Membran wurde anschließend 3 × mit Waschpuffer (1 × TBS, 0,4 % Tween 20) gewaschen. Der Primärantikörper wurde nach Herstellerangaben in Antikörperverdünnungspuffer (1 × TBS, 0,1 % Tween 20, 5 % BSA, 0,1 % Natriumazid) verdünnt und über Nacht bei 4 °C gebunden. Nichtgebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen entfernt und anschließend der Sekundärantikörper aufgetragen. Dieser wurde nach Herstellerangaben in Antikörperverdünnungspuffer (1 × TBS, 0,1 % Tween 20, 5 % Milchpulver) verdünnt und bei RT für mind. 2 h gebunden. Die Membran wurde vor der Detektion 3 × gewaschen. Der Sekundärantikörper ist mit einer Peroxidase (*horse raddish peroxydase*, HRP) gekoppelt, die die Detektion ermöglicht. Dabei wird der Umsatz von Wasserstoffperoxid (*Lumi-light Western Blotting substrate*, Roche) durch die Peroxidase unter Lichtemission bei 425 nm gemessen (LAS 3000, Fujifilm). Da Tween 20 die Peroxidase-Reaktion stört, wurde die Membran unmittelbar vor der Messung in 1 × TBS gewaschen. Um die korrekte Beladung bzw. die Vollständigkeit des *Blottens* zu überprüfen, wurden zusätzlich β -Aktin oder GAPDH als interner Standard nachgewiesen. Die Auswertung der Bandenintensitäten erfolgte mittels der AIDA-Software.

4.5 Molekularbiologische Methoden

4.5.1 mRNA-Isolierung

Zur RNA-Isolierung wurden mind. 1×10^5 Zellen geerntet. Die Zellpellets wurden bei -20°C gelagert oder direkt aufgearbeitet. Zur Isolierung der RNA wurde das NukleoSpin® RNA II-Kit (Machery-Nagel) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die RNA wurde nach Abschluss der Reinigung ein zweites Mal verdaut. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 4.10 dargestellt. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur für 30 Minuten und wurde durch Zugabe von 3 μ l EDTA (50 mM), sowie einer Inkubation für 10 Minuten bei 65 °C gestoppt.

Tabelle 4.10 Reaktionsansatz eines DNA-Verdaus

Reagenz	Volumen
Nukleinsäurelösung	x μ l (3 μ g)
DNase I <i>reaction buffer</i>	3 μ l
DNase I	1 μ l
RNase-freies H ₂ O (Ampuva)	ad 30 μ l

Um den Erfolg der RNA-Reinigung zu kontrollieren, wurde eine β -Aktin PCR (Polymerase-Kettenreaktion) durchgeführt. Der verwendete Reaktionsansatz und das verwendete PCR-Programm sind in Tabelle 4.11 und 4.12 dargestellt.

Tabelle 4.11 Reaktionsansatz für eine β -Aktin PCR

Reagenz	Volumen
RNase-freies H ₂ O	19,5 μ l
10 x PCR Rxn Puffer	2,5 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 μ l
dNTP-Mix	0,5 μ l
β -Aktin Primer (<i>forward, reverse</i>)	0,25 μ l
Polymerase (Taq)	0,25 μ l

Tabelle 4.12 Thermocycler-Programm für eine β -Aktin PCR

Temperatur (°C)	Zeit (Sek.)	Anzahl der Durchläufe
96	3	1
96	} 30	} 29
60		
72		
72	5min	1
10	∞	1

Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte unter Verwendung eines 2 %igen Agarosegels (mit Ethidiumbromid). Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte bei 100 V für 20 min. War der DNA-Verdau erfolgreich, sollten keine Banden im UV-Licht detektierbar sein, da die Taq-Polymerase nur DNA als *Template* nutzt.

4.5.2 cDNA-Synthese

Die isolierte RNA wurde in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und für die quantitative *real-time*-PCR eingesetzt. Dazu wurde das *RevertAid™ H minus first strand cDNA kit* (Fermentas) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Das verwendete Thermocycler-Programm ist in Tabelle 4.13 dargestellt.

Tabelle 4.13 Thermocycler-Programm zur cDNA-Synthese

Temperatur (°C)	Zeit	Anzahl der Durchläufe
70	5 min	1
4	∞	1
25	5 min	1
42	1 h	1
72	10min	1
4	∞	1

Die Konzentration der synthetisierten cDNA wurde auf 25 ng/ μ l eingestellt. Zur Überprüfung der cDNA-Synthese wurde erneut eine β -Aktin PCR durchgeführt. Im anschließend angefertigten Agarosegel sollten bei erfolgreicher Synthese Banden detektierbar sein.

4.5.3 Quantitative *real-time*-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR wurde mit dem Platinum® SYBR® *green qPCR SuperMix-UDG kit* (life Technologies™) nach Herstellerangaben durchgeführt (Seliger et al. 2011). Es wurden jeweils drei biologische Replikate angefertigt. Um Kontaminationen auszuschließen, wurde eine *non-Template* Kontrolle mitgeführt. Das verwendete Zweischritt qRT-PCR-Programm ist in Tabelle 4.14 aufgeführt.

Tabelle 4.14 Thermocycler-Programm zur qRT-PCR

Schritt	Zeit	Temperatur (°C)	
Taq-Aktivierung	2 min	95	} 40 Zyklen
Hybridisierung	10 sek	95	
<i>annealing</i> und <i>elongation</i>	30 sek	60/65	

Die Auswertung erfolgte mittels *Rotor gene 6000 series software 1.7*. Damit wurden *take off*-Wert (Zyklus, ab dem die Fluoreszenz das Hintergrundrauschen übersteigt) und Amplifikationsrate (Effizienz) ermittelt. Daraus konnte nun die Expressionsrate des Zielgens quantifiziert werden. Als Referenzgene dienten Delta-Aminolävulinatsynthetase, Peptidylprolyl-Isomerase und RNA Polymerase II (ALAS1, PPIA und POLR2B).

5 Ergebnisse

5.1 Wirkung verschiedener Tyrosinkinaseinhibitoren auf ausgewählte Nierenzellkarzinom-Zelllinien

Im Fokus dieser Arbeit sollte zunächst die Wirkung der Tyrosinkinaseinhibitoren Sunitinib, Sorafenib und Axitinib auf das Proteom ausgewählter NZK-Zellen stehen, um mögliche Biomarker für den Behandlungsverlauf abzuleiten. Dafür mussten die effektiven Wirkkonzentrationen der TKI für die Kultivierung der verschiedenen NZK-Zelllinien ermittelt werden.

5.1.1 TKI-vermittelte Reduktion der Zellviabilität und Bestimmung der IC₅₀-Werte

Die Bestimmung der IC₅₀-Werte erfolgte mittels XTT-Assay (Abschnitt 4.1.2.). Zur Ermittlung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC₅₀-Wert) wurden verschiedene NZK-Zelllinien mit Wirkstoffkonzentrationen von 0-100 µM für einen Zeitraum von 72 h behandelt. Tabelle 5.1 zeigt die mittels Formel 4.1 bestimmten IC₅₀-Werte der TKIs Sunitinib, Sorafenib und Axitinib für die NZK-Zelllinien MZ1257RC, MZ1795RC sowie MZ2905RC. Überraschenderweise lagen die IC₅₀-Werte von Sunitinib und Axitinib deutlich oberhalb der bei Standarddosierung der TKI ermittelten physiologischen TKI-Konzentrationen im Plasma der Patienten (Sunitinib: 0,06-0,1 µM (Minkin et al. 2008), Sorafenib: 15 µM (Awada et al. 2005; Strumberg et al. 2005), Axitinib: 0,1-0,2 µM (Rugo et al. 2005; Sharma et al. 2010)). Für alle folgenden Experimente wurden die in Tabelle 5.1 angegebenen Wirkstoffkonzentrationen zur effektiven Behandlung der NZK-Zelllinien verwendet. Unter Verwendung von Axitinib konnte nur eine unvollständige Inhibierung der metabolischen Aktivität der NZK-Zelllinien für den gemessenen Zeitraum beobachtet werden. Die Zellen behielten metabolische Restaktivitäten von 45 % (MZ1257RC), 30 % (MZ1795RC) und 10 % (MZ2905RC).

Tabelle 5.1 IC₅₀-Werte der verwendeten TKI

Der IC₅₀-Wert ist definiert als die inhibitorische Wirkstoffkonzentration, die das Zellwachstum im Vergleich zur Kontrolle um 50 % inhibiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± S.D. aus drei unabhängigen Experimenten angegeben.

Zelllinie	IC ₅₀ Sunitinib (µM)	IC ₅₀ Sorafenib (µM)	IC ₅₀ Axitinib (µM)
MZ1257RC	10,5 ± 2,0	21,8 ± 2,1	5,1 ± 0,4
MZ1795RC	11,6 ± 2,4	25,6 ± 4,2	1,1 ± 0,2
MZ2905RC	9,6 ± 0,9	17,6 ± 2,3	5,2 ± 0,4

5.1.2 TKI-vermittelte Inhibierung der Phosphorylierung von Rezeptortyrosinkinasen

Um den Nachweis zu erbringen, dass die verwendeten TKI-Konzentrationen in der Lage sind, ihre Zielstrukturen zu inhibieren, sollte zunächst die TKI-vermittelte Inhibierung der Phosphorylierung von VEGFR, einer wichtigen Zielstruktur der TKI, analysiert werden. Da jedoch kein Antikörper gefunden wurde, der im NZK-System ein Signal zeigte, wurde die TKI-induzierte Inhibierung der Phosphorylierung der abwärts gelegenen *extracellular-signal regulated kinase* (ERK) mittels *Western Blot* überprüft. Erstaunlicherweise wurde der Phosphorylierungsstatus von ERK durch Anwesenheit der TKI nicht verändert. Es konnte trotz der TKI-vermittelten Reduktion der Zellviabilität keine Inhibierung der Phosphorylierung von ERK (Abb. 5.1) nach 72 h Behandlung detektiert werden.

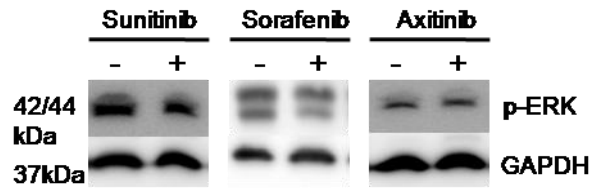


Abbildung 5.1 Aktivierungsmuster von ERK nach TKI-Behandlung am Beispiel von MZ1257RC

MZ1257RC-Zellen wurden für 72 h in Ab- bzw. Anwesenheit von Sunitinib, Sorafenib oder Axitinib (jeweils 10 μM) inkubiert, bevor jeweils 50 μg Protein/Bahn mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und die Proteine unter Verwendung des entsprechenden Antikörpers (Cell Signaling) detektiert und anschließend quantifiziert wurden. Die Visualisierung von GAPDH diente als Ladekontrolle.

5.1.3 TKI-vermittelte Regulation verschiedener Apoptose-assoziiierter Proteine

Da die TKI Dosis-abhängig zum Tod der verwendeten NZK-Zelllinien führten (Abschnitt 5.1.1), wurde der Einfluss der TKI auf verschiedene Apoptose-assoziierte Proteine untersucht. Die NZK-Zelllinien MZ1257RC, MZ1795RC und MZ2905RC wurden für jeweils 72 h mit dem entsprechenden TKI behandelt und anschließend das Zelllysat mittels *Western Blot* analysiert. Zunächst wurde die TKI-induzierte Aktivierung der Effektor-Caspase 3 analysiert. Abbildung 5.2 zeigt die Induzierung der Aktivierung der Effektor-Caspase 3 am Beispiel der NZK-Zelllinie MZ1257RC in Anwesenheit von 10 μM Sunitinib bzw. Axitinib. In Anwesenheit von 10 μM Sorafenib, einer Konzentration die unter dem in Abschnitt 5.1.1. angegebenen IC_{50} -Werten liegt, konnte keine Aktivierung der Effektor-Caspase 3 detektiert werden. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse, wurden die Effekte der TKI auf Caspase 3 bei einer einheitlichen TKI-Konzentration von 10 μM durchgeführt.

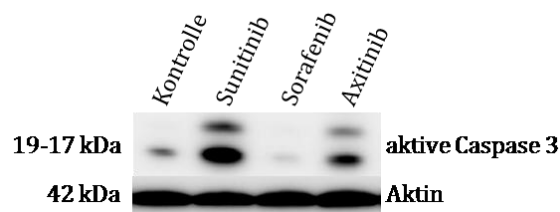


Abbildung 5.2 TKI-vermittelte Regulation der Aktivierung von Caspase 3 in MZ1257RC

Die Zelllinie MZ1257RC wurde für 72 h in Ab- bzw. Anwesenheit von Sunitinib, Sorafenib oder Axitinib (jeweils 10 μM) inkubiert, bevor jeweils 50 μg Protein/Bahn mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und die aktive Caspase 3 unter Verwendung des entsprechenden Antikörpers (Cell Signaling) detektiert und quantifiziert wurde. Die Visualisierung von β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Die weiterführende Analyse verschiedener Proteine, die an der Regulation der Apoptose beteiligt sind, zeigte in Abhängigkeit vom verwendeten TKI ein sehr heterogenes Proteinmuster. Wie in Tabelle 5.2 gezeigt, regulieren die verschiedenen TKI die Expression ausgewählter Apoptose-assoziiierter Proteine unterschiedlich.

Tabelle 5.2 TKI-vermittelte Regulation der Expression verschiedener Apoptose-assoziiierter Proteine im NZK

	MZ1257RC	MZ1795RC	MZ2905RC
10 µM Sunitinib			
BAG-1	↓	↓	↓
Bcl-2	↔	↓	↑
Beclin-1	↓	↑	↓
Mcl-1	↓	↓	↓
Survivin	↓	↓	↓
Stat-3	↓	↓	↓
10 µM Sorafenib			
BAG-1	↓	↓	↓
Bcl-2	↓	↓	↓
Beclin-1	↓	↓	↓
Mcl-1	↓	↓	↓
Survivin	↓	↓	↓
Stat-3	↔	↓	↓
10 µM Axitinib			
BAG-1	↓	↑	↓
Bcl-2	↓	↓	↓
Beclin-1	↓	↔	↓
Mcl-1	↓	↓	↓
Survivin	↓	↓	↓
Stat-3	↑	↔	↓

Zwei Proteine lagen unter allen experimentellen Bedingungen herunter reguliert vor: Survivin und Mcl-1. Survivin wurde bereits als potentieller Biomarker für die Diagnostik und Prognose von Krebserkrankungen beschrieben (Belmar and Fesik 2015; Fukuda and Pelus 2006). In Assoziation verschiedener Mitglieder der Apoptose-regulierenden Bcl-2 Proteinfamilie, ist das *Myeloid Cell Leukemia 1* Protein (Mcl-1) in der Lage sowohl den intrinsischen (Bax, Bak, Bid, Puma, tBid und Noxa) als auch den extrinsischen (tBid) Apoptoseweg zu inhibieren. Innerhalb dieser Arbeit konnte eine Verringerung der Expression beider Proteine nach Behandlung aller drei untersuchten Zelllinien mit allen drei TKIs nachgewiesen werden (Abbildung 5.3 A). Sunitinib ist zudem in der Lage den *signal transducer and activator of transcription 3* (Stat3) in seiner Expression zu hemmen. Stat3 wird unter anderem von Wachstumsfaktoren, wie der Sunitinib Zielstruktur VEGF, aktiviert. Es liegt in allen drei Zelllinien nach Sunitinib-Behandlung herunter reguliert vor (Abbildung 5.3 B). Der *BAG family molecular chaperone regulator 1* (BAG1) wird sowohl von Sunitinib, als auch von Sorafenib herunter reguliert (Abbildung 5.3 C). Es ist an diversen zellulären Prozessen, wie Überleben, Stressantwort, Proliferation, Apoptose, Migration und Proteinfaltung/-abbau, beteiligt und wurde in Tumorzellen in hohen Konzentrationen im Vergleich zu Normalgewebe nachgewiesen (Murphy 2013). Die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 wird in Anwesenheit von Sorafenib und Axitinib in allen drei Zelllinien herunter reguliert (Abbildung 5.3D). Sorafenib ist außerdem in der Lage die Expression von Beclin-1 (*coiled-coil, myosin-like Bcl2-interacting protein, Atg6*) zu inhibieren (Abbildung 5.3 E).

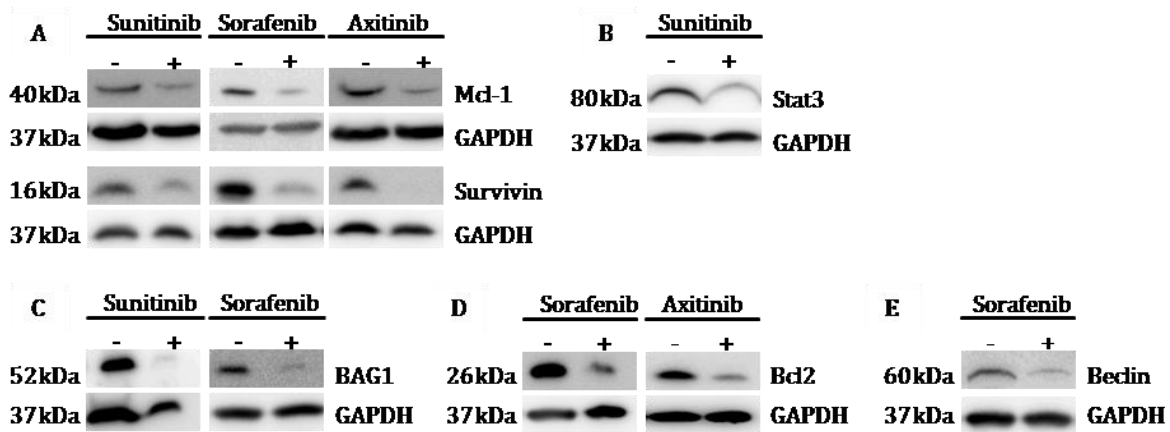


Abbildung 5.3 TKI-vermittelte Herunterregulation der Expression einiger Vertreter der Bcl2-Protein-Familie sowie von Stat3 am Beispiel der NZK-Zelllinie MZ1257RC.

MZ1257RC-Zellen wurden für 72 h in Ab- bzw. Anwesenheit von Sunitinib, Sorafenib oder Axitinib (jeweils 10 μ M) inkubiert, bevor jeweils 50 μ g Protein/Bahn mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und die verschiedenen Proteine unter Verwendung der entsprechenden Antikörper (*Bcl-2 Related Sampler Kit* (BD); Anti-Stat3, Anti-GAPDH (Cell Signaling)) detektiert und anschließend quantifiziert wurden. Die Visualisierung von GAPDH diente als Ladekontrolle.

5.1.4 TKI-induzierte Veränderungen des Proteommusters verschiedener NZK-Zellen

Um weitere mögliche Biomarker zur Kontrolle des Therapieverlaufs zu finden, wurden Proteomanalysen sowohl intrazellulär als auch extrazellulär an NZK-Zellen in An- und Abwesenheit der verschiedenen TKI durchgeführt. Die Analysen wurden am Modell der NZK-Zelllinie MZ1257RC unter Verwendung der jeweiligen IC₅₀-Konzentrationen durchgeführt. Bei Experimenten die unter Verwendung der physiologischen Sunitinib-(0,06-0,1 μ M; (Minkin et al. 2008)) bzw. Axitinib (0,1-0,2 μ M; (Rugo et al. 2005))-Konzentrationen durchgeführt wurden, konnten keine Veränderungen im intra- und extrazellulären Proteommuster detektiert werden. Der schematische Aufbau einer Proteomanalyse ist in Abb. 5.4 dargestellt. Nur Protein-Spots die bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $\leq 0,05$ einen Regulationsfaktor von ≥ 2 aufwiesen wurden weiterführend analysiert (Tabelle 5.3).

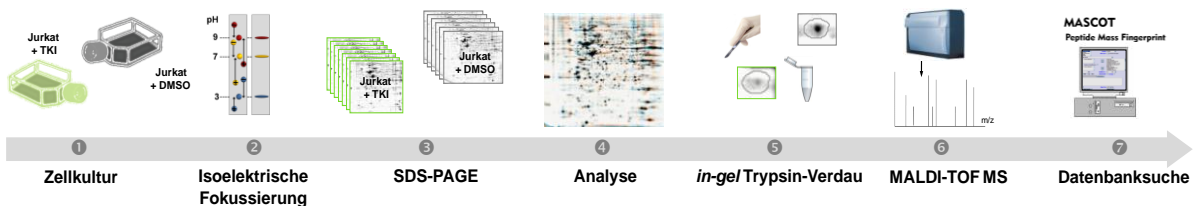


Abbildung 5.4 Schematischer Ablauf der durchgeführten Proteomanalysen

Bei der Verwendung von TKI-Konzentrationen, die dem jeweiligen IC₅₀-Werten entsprachen, konnten bei der Analyse des intrazellulären Proteommusters nur minimale Veränderungen detektiert werden. So wurden unter Sunitinib-Behandlung (10 μ M, 72h) nur 12 differenziell exprimierte Proteine identifiziert. Davon waren 8 Proteine runter und 4 hoch reguliert. Nach Sorafenib-Behandlung (15 μ M, 72h) wurden 20 differenziell exprimierte Proteine identifiziert (10 hoch, 10 runter reguliert) und nach Axitinib-Behandlung (5 μ M, 72h) 2 (1 hoch, 1 runter

reguliert). Jedoch konnte die TKI-vermittelte Regulation dieser Proteine, die unter Verwendung 5 biologischer Replikate in einem Proteomexperiment identifiziert wurden, weder auf mRNA-Ebene noch mittels Western Blot-Analyse verifiziert werden.

Tabelle 5.3 intrazelluläre TKI-regulierte Proteine der Zelllinie MZ1257RC (nach 72h Behandlung)

Behandlung	Proteinname	Regulationsfaktor
Sunitinib	<i>Nuclear mitotic apparatus protein 1</i>	2,9 ± 0.1
Sunitinib	<i>Kinesin-like protein KIF16B</i>	2,8 ± 0,2
Sunitinib	<i>Cellular nucleic acid-binding protein</i>	2,3 ± 0.1
Sunitinib	<i>protein NDRG1</i>	2,1 ± 0.1
Sunitinib	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L</i>	0,5 ± 0.1
Sunitinib	<i>THO complex subunit 3</i>	0,5 ± 0.2
Sunitinib	<i>Mitotic spindle-associated MMXD complex subunit MIP18</i>	0,5 ± 0.1
Sunitinib	<i>Stathmin</i>	0,4 ± 0.2
Sunitinib	<i>Insuline-degrading enzyme</i>	0,4 ± 0.1
Sunitinib	<i>Transcription factor BTF3</i>	0,4 ± 0.1
Sunitinib	<i>MOB kinase activator 1A</i>	0,4 ± 0.1
Sunitinib	<i>Cyclin-dependent kinase 1</i>	0,3 ± 0.1
Axitinib	<i>Copine-7</i>	2,1 ± 0.1
Axitinib	<i>Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1</i>	0,4 ± 0.1
Sorafenib	<i>Stress-70 protein, mitochondrial</i>	4,9 ± 0.3
Sorafenib	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	2,9 ± 0.1
Sorafenib	<i>Glycine-tRNA ligase</i>	2,6 ± 0.1
Sorafenib	<i>Tryptophan-tRNA ligase</i>	2,6 ± 0.1
Sorafenib	<i>Elongation factor 2</i>	2,5 ± 0.1
Sorafenib	<i>Thimet oligopeptidase</i>	2,5 ± 0.1
Sorafenib	<i>Pyruvate kinase isoenzymeM1/M2</i>	2,4 ± 0.2
Sorafenib	<i>Vimentin</i>	2,2 ± 0.1
Sorafenib	<i>Phosphoserine aminotransferase</i>	2,1 ± 0.1

Sorafenib	<i>78kDa glucose-regulated protein</i>	2,1 ± 0.1
Sorafenib	<i>Cytochrome b-c1 complex Subunit1 , mitochondrial</i>	0,5 ± 0.1
Sorafenib	<i>Heat shock protein HSP90</i>	0,5 ± 0.1
Sorafenib	<i>Mitochondrial inner membrane protein</i>	0,5 ± 0.1
Sorafenib	<i>Cold shock domain-containing protein E1</i>	0,5 ± 0.1
Sorafenib	<i>Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial</i>	0,5 ± 0.1
Sorafenib	<i>Pyruvate carboxylase, mitochondrial</i>	0,5 ± 0.2
Sorafenib	<i>Golgi phosphoprotein</i>	0,4 ± 0.1
Sorafenib	<i>Stomatin-like protein 2</i>	0,4 ± 0.1
Sorafenib	<i>GrpE protein homolog, mitoch.</i>	0,4 ± 0.1
Sorafenib	<i>Actin, cytoplasmatic 2</i>	0,3 ± 0.2

Zur Überprüfung, ob die therapeutische Wirkung der TKI möglicherweise extrazellulär erfolgt, wurde eine Analyse des extrazellulären Proteoms der Modellzelllinie MZ1257RC durchgeführt. Auf Grund des großen Materialaufwandes und der Menge an benötigtem Protein, wurde die NZK-Zelllinie MZ1257RC als Modellzelllinie gewählt, da diese Zelllinie in Vorversuchen die höchste Menge an Protein ins Medium sezernierte. Die Gesamtheit aller Proteine des Zellkulturüberstandes setzt sich aus aktiv sekretierten (z.B. der extrazellulären Matrix), durch Ektodomänen *shedding* abgelösten, in Membranvesikeln eingeschlossenen und unspezifisch durch Apoptose freigesetzten Proteinen zusammen und wird im Folgenden als Sekretom bezeichnet. Um den Anteil an durch Apoptose freigesetzten Proteinen möglichst gering zu halten, wurden nur die Zellkulturüberstände gesammelt, bei denen die Sunitinib-behandelten Zellen einen Apoptose/Nekrose-Anteil von unter 8 % aufwiesen. Axitinib und Sorafenib zeigten in Vorversuchen einen zu hohen Apoptose/Nekrose-Anteil, sodass nur Sunitinib für die Analyse des Sekretoms Verwendung fand. Die Zellen wurden wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben kultiviert. Es wurde jeweils 1 L Kulturüberstand in Ab- und Anwesenheit von 5 µM Sunitinib gesammelt und daraus die extrazellulären Proteine mittels NaDoc/TCA-Fällung (Leich et al. 2007) isoliert. Mit dieser Methode wurden alle extrazellulär vorkommenden Proteine erfasst, unabhängig davon, ob die Freisetzung ins extrazelluläre Milieu exosomal, durch Sekretion oder durch Membran-*shedding* erfolgte.

In zwei unabhängigen Versuchen wurden insgesamt 69 regulierte Proteine identifiziert. 25 Proteine wurden in beiden Versuchen identifiziert und sind in Tabelle 5.4 aufgelistet. Von diesen intern validierten Sunitinib-regulierten Proteinen waren 23 herunter und 2 hoch reguliert.

Tabelle 5.4 Extrazelluläre Sunitinib-regulierte Proteine der NZK-Zelllinie MZ1257RC (72 h, 5 µM Sunitinib)

Gen-Name	Protein	Regulationsfaktor
CTSL	<i>Cathepsin L1</i>	2,3 ± 0,2
SPARC	<i>SPARC</i>	2,5 ± 0,3
ENO1	<i>Alpha-enolase</i>	0,5 ± 0,1
HSP90AB1	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	0,5 ± 0,1
ARHGDI1	<i>Rho GDP-dissociation inhibitor 1</i>	0,5 ± 0,1
VCL	<i>Vinculin</i>	0,5 ± 0,1
WDR1	<i>WD repeat-containing protein 1</i>	0,5 ± 0,1
YWHAZ	<i>14-3-3 protein ζ/δ</i>	0,4 ± 0,1
HSPA5	<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	0,4 ± 0,1
EEF1G	<i>Elongation factor 1-gamma</i>	0,4 ± 0,1
GARS	<i>Glycine-tRNA ligase</i>	0,4 ± 0,1
PKM	<i>Pyruvate kinase PKM</i>	0,4 ± 0,1
ACTB	<i>Actin, cytoplasmic 1</i>	0,3 ± 0,1
CCT2	<i>T-complex protein 1 subunit beta</i>	0,3 ± 0,1
CCT5	<i>T-complex protein 1 subunit epsilon</i>	0,3 ± 0,1
CLIC1	<i>Chloride intracellular channel protein 1</i>	0,3 ± 0,1
CFL1	<i>Cofilin-1</i>	0,3 ± 0,1
DNAJB11	<i>DnaJ homolog subfamily B member 11</i>	0,3 ± 0,1
EEF2	<i>Elongation factor 2</i>	0,3 ± 0,1
CAPZB	<i>F-actin-capping protein subunit beta</i>	0,3 ± 0,1
IDH1	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic</i>	0,3 ± 0,1
NNMT	<i>Nicotinamide N-methyltransferase</i>	0,3 ± 0,1
PPIA	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A</i>	0,2 ± 0,1
AHCY	<i>Adenosylhomocysteinase</i>	0,2 ± 0,1
CCT8	<i>T-complex protein 1 subunit theta</i>	0,2 ± 0,1

Um zu analysieren welche biologischen Prozesse von der Regulation der identifizierten Proteine betroffen sind, wurden die differentiell synthetisierten Proteine (Factor ≥ 2.0) mit Hilfe des *Functional Annotation Cluster* (FAC) Werkzeugs der *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) [<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>] klassifiziert. Es wurden 28 funktionelle Proteincluster identifiziert. Abbildung 5.5 zeigt die funktionellen Cluster, die signifikante p-Werte aufwiesen. Die *gene ontology* (GO)-Kriterien „Biologischer Prozess“ (A), „Zelluläre Lokalisation“ (B) und „Molekulare Funktion“ (C) wurden für die Annotierung verwendet.

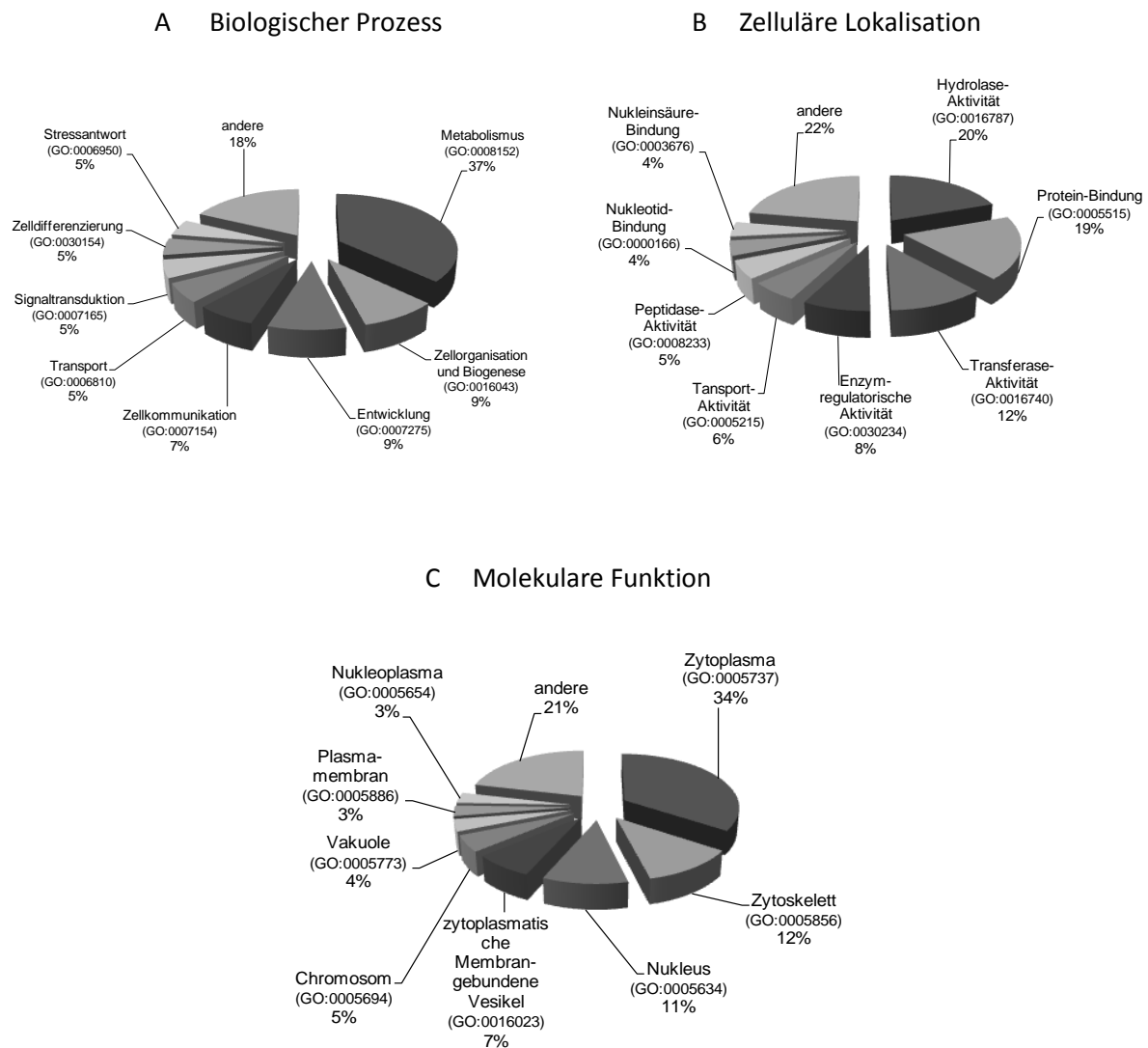


Abbildung 5.5 Klassifizierung der 69 identifizierten extrazellulären Proteine nach ihren GO-Kriterien

Tabelle 5.5 zeigt alle im Sekretom identifizierten Proteine, eingeordnet in ihr jeweiliges *annotation cluster*. Die Zuordnung ist unterteilt in Lokalisation und Funktion. Intern validierte Proteine sind mit einem Stern markiert. Bei Betrachtung der aufgelisteten funktionellen Cluster wird deutlich, dass durch Sunitinib verschiedene Proteine mit Lokalisation in Membran-gebundenen Vesikeln herunter reguliert wurden (HSP90AB1 und HSPA5). Dies legt die

Vermutung nahe, dass Sunitinib den extrazellulären Raum exosomal moduliert. Dabei werden proteolytische Enzyme unter Sunitinib-Behandlung hochreguliert (Cathepsin D und Z), wohingegen verschiedene Proteine mit Funktionen bei der *unfolded proteine response* UPR (HSPA5 und HSPA8) herunter reguliert vorliegen. Weiterhin wurden auch Proteine, die an der negativen Regulation der Apoptose beteiligt sind (HSPA5, 14-3-3 ϵ) oder der Redox-Homöostase dienen (Peroxyredoxin-2) ebenfalls herunter reguliert. Dies zeigt, dass Sunitinib die Zelle destabilisiert und so in Richtung Apoptose beeinflusst, was mit den Daten zur Zellviabilität und Apoptose übereinstimmt. Proteine, die mit der Immunantwort verknüpft sind (Peroxyredoxin-2 und 14-3-3 ζ/δ) werden ebenfalls herunter reguliert, was darauf hindeutet, dass Sunitinib die immunsuppressive Wirkung von Tumorzellen beeinflussen kann.

Tabelle 5.5 Funktionelle Zuordnung der identifizierten Sekretomproteine in die mittels *GO-Miner Software* festgelegten *annotation cluster*

Gen-Name	Protein-Name	Funktion
	Lokalisation in Membran-gebundenen Vesikeln	
AHCY	Adenosylhomocysteinase ↓	vermutlich Schlüsselrolle in Methylierungskontrolle über Regulation der intrazellulären Konzentration von Adenosylhomocystein
FASN	Fettsäure-Synthase ↓	Synthese von langkettigen Fettsäuren
FN1	Fibronektin ↓/↑	involviert in Zelladhäsion, Zellmotilität, Oponization, Wundheilung, Erhaltung der Zellform
GARS*	Glycin-tRNA Ligase ↓	katalysiert die Verknüpfung von Glycin zu tRNA(Gly)
HSP90AB1*	<i>heat shock protein</i> HSP 90- β ↓	Molekulares Chaperon
HSPA5*	Glukose-reguliertes Protein (78 kDa) ↓	Anreicherung multimerer Proteinkomplexe innerhalb des endoplasmatischen Retikulums
HSPA8	<i>heat shock cognate protein</i> (71 kDa) ↓	Repressor der transkriptionalen Aktivierung
NEU1	Sialidase-1 ↓	katalysiert die Entfernung von Sialinsäurederivaten von Glycoproteinen und Glycolipiden
PRDX6	Peroxyredoxin-6 ↓	Redoxregulation
YWHAE	14-3-3 Protein ϵ ↓	Adapterprotein impliziert in der Regulation eines breiten Spektrums an Signalwegen

YWHAZ*	14-3-3 Protein ζ/δ ↓	Adapterprotein impliziert in der Regulation eines breiten Spektrums an Signalwegen
CTSD	Cathepsin D ↑	saure Protease aktiv in intrazellulärem Proteinabbau
SPARC*	<i>secreted protein acidic and rich in cystein</i> ↑	reguliert Zellwachstum durch Interaktionen mit der extrazellulären Matrix und Zytokinen
sekretierte Proteine		
GARS*	Glycin-tRNA Ligase ↓	katalysiert die Verknüpfung von Glycin zu tRNA(Gly)
YWHAZ*	14-3-3 Protein ζ/δ ↓	Adapterprotein impliziert in der Regulation eines breiten Spektrums an Signalwegen
EXOC8	<i>exocyst complex component 8</i> ↑	Komponente des Exozysten-Komplex involviert in der Ankopplung der exozystischen Vesikel
Funktion in der Proteolyse		
ATP6AP2	Renin-Rezeptor ↓	vermutlich Rolle im Reninangiotensin-System (RAS)
CNDP2	CNDP Dipeptidase 2 ↓	Hydrolysiert Dipeptide
PSME1	Proteasom-Aktivator 28 Untereinheit α ↓	impliziert in Immunoproteasomanreicherung und nötig für effiziente Antigen-Prozessierung
PSME2	Proteasom-Aktivator 28 Untereinheit β ↓	impliziert in Immunoproteasomanreicherung und nötig für effiziente Antigen-Prozessierung
PSMA1	Proteasom-Untereinheit α Typ 1 ↓	Komponente eines multikatalytischen Proteinase Komplexes
PSMB2	Proteasom-Untereinheit β Typ 2 ↓	Komponente eines multikatalytischen Proteinase Komplexes
UCHL1	Ubiquitin-Thioesterase L1 ↓	Prozessierung von Ubiquitinvorläufern und ubiquitinierten Proteinen
CTSD	Cathepsin D ↑	saure Protease aktiv in intrazellulärem Proteinabbau
CTSZ	Cathepsin Z ↑	Carboxy-Monopeptidase und Carboxy-Dipeptidase Aktivität
LGMN	Legumain ↑	vermutlich involviert in der Prozessierung der Antigenpresentation von MHC Klasse II-Proteinen im lysosomal/endosomalen System

LTA4H	Leukotrien-A(4)-Hydrolase ↑	Epoxid Hydrolase; Katalysiert den letzten Schritt der Biosynthese des proinflammatorischen Mediators Leukotrien B4
Funktion innerhalb der Apoptose-Regulation		
ARHGDI1*	Rho GDP-Dissoziations-Inhibitor-1 ↓	reguliert die GDP/GTP-Austauschreaktion der Rho-Proteine
CFL1	Cofilin-1 ↓	bindet an F-actin und zeigt pH-sensitive F-actin Depolymerisierungsaktivität
GCLM	<i>GCS light chain</i> ↓	Gluthathionbiosynthese
HSPA5*	Glukose-reguliertes Protein (78 kDa) ↓	Anreicherung multimerer Proteinkomplexe innerhalb des endoplasmatischen Retikulums
NME1	Nukleosid-Diphosphat-Kinase A ↓	Synthese von Nukleosidtriphosphaten neben ATP
PRDX2*	Peroxiredoxin 2 ↓	Redoxregulation
TPT1	Fortilin ↓	involviert in Calcium-Bindung und Mikrotubuli-Stabilisierung
TUBB	<i>tubulin β-chain</i> ↓	Hauptbestandteil von Mikrotubuli
YWHAE	14-3-3 Protein ε ↓	Adapterprotein impliziert in der Regulation eines breiten Spektrums an Signalwegen
YWHAZ*	14-3-3 Protein ζ/δ ↓	Adapterprotein impliziert in der Regulation eines breiten Spektrums an Signalwegen
Funktion innerhalb der Immunantwort		
PRDX2*	Peroxiredoxin 2 ↓	Redoxregulation
TUBB	<i>tubulin β-chain</i> ↓	Hauptbestandteil von Mikrotubuli
YWHAZ*	14-3-3 Protein ζ/δ ↓	Adapterprotein impliziert in der Regulation eines breiten Spektrums an Signalwegen

Die Sunitinib-vermittelte Regulation einiger interessanter Proteine wurde weiterführend untersucht, um zu überprüfen, ob die intra- und extrazellulär regulierten Proteine bereits auf mRNA-Ebene durch Sunitinib beeinflusst werden. Für sieben der unter Tabelle 5.4 und 5.5 aufgelisteten differentiell exprimierten Proteine konnte auch auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR eine Sunitinib-vermittelte Regulation bestätigt werden (Abbildung 5.6). SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteine* oder Osteonektin) und CTSL (Cathepsin L1) werden bereits auf mRNA-Ebene hochreguliert. YWHAZ (14-3-3 ζ/δ), HSPA5 (Glukose-reguliertes Protein 78 kDa), DNAJB11 (*Dnaj homolog subfamily B member 11*), CCT5 (*T-complex protein 1 subunit epsilon*) und ENO1 (Alpha-Enolase) werden dagegen auch auf mRNA-Ebene bereits herunter reguliert.

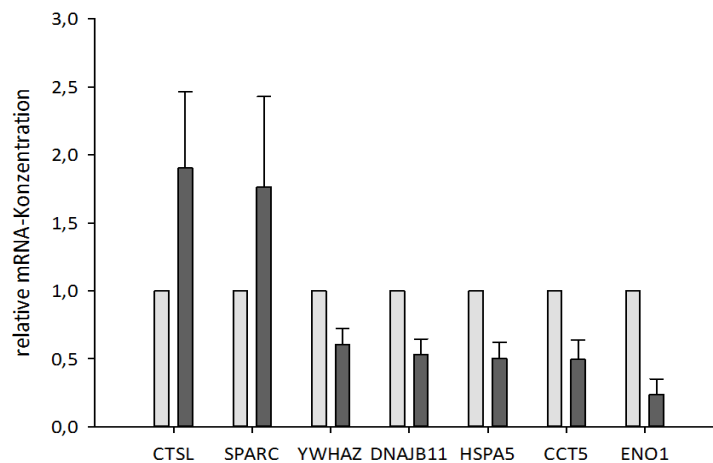


Abbildung 5.6 qRT-PCR-Daten zur Validierung der Sekretom-Ergebnisse

MZ1257RC-Zellen wurden für 72 h in Ab- bzw. Anwesenheit von Sunitinib (5 μ M) inkubiert. Die mRNA wurde mit Hilfe des NukleoSpin[®] RNA II-Kit (Machery-Nagel) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem *RevertAid[™] H minus first strand cDNA kit* (Fermentas) in cDNA umgeschrieben. Die qRT-PCR wurde mit dem *Platinum[®] SYBR[®] green qPCR SuperMix-UDG kit* (life Technologies[™]) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Daten ergeben sich aus dem Mittelwert \pm S.D. aus 3-4 unabhängigen Experimenten. □ Kontrolle, ■ Sunitinib

Auf Grund des enorm hohen Material- und Zeitaufwandes, konnte nicht genügend Probenmaterial generiert werden, um alle regulierten Proteine im *Western Blot* zu validieren. Die Auswahl fiel auf das hochkonservierte Protein 14-3-3 ζ/δ und das an der Zellmotilität involvierte Protein SPARC. Die Validierung der Sunitinib-vermittelten Regulation von 14-3-3 ζ/δ und SPARC erfolgte unter Verwendung von Zellkulturüberständen in Ab- und Anwesenheit von Sunitinib und konnte für die NZK-Zelllinie MZ1257RC mittels *Western Blot* bestätigt werden. Das Protein 14-3-3 ζ/δ liegt für die Modell-Zelllinie MZ1257RC bei einer Sunitinib-Konzentration von 5 μ M herunter reguliert vor (Abbildung 5.7). Zudem konnte auch die Hochregulation vom Osteonektin im *Western Blot* verifiziert werden (Abbildung 5.7). Weiterhin wurde die Sunitinib-vermittelte Regulation des *heat shock cognate 71 kDa proteins* HSPA8 näher untersucht. Dieses Protein wurde zwar nur in Einfachbestimmung als durch Sunitinib herunter reguliert identifiziert, seine Rolle als wichtiger Exosomenmarker rechtfertigte jedoch eine weiterführende Analyse. Auch die Regulation dieses Proteins konnte unter Sunitinib-Behandlung für die Zelllinie MZ1257RC im *Western Blot* bestätigt werden (Abbildung 5.7).

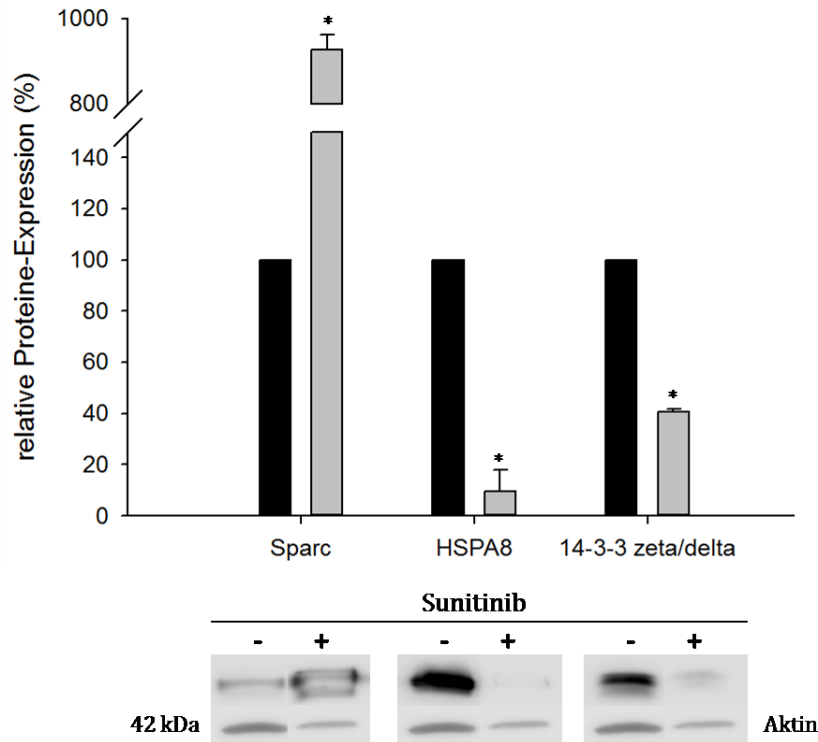


Abbildung 5.7 Western Blot Analysen von SPARC, 14-3-3 zeta/delta und HSPA8 im Sekretom von MZ1257RC. MZ1257RC-Zellen wurden für 72 h in Ab- bzw. Anwesenheit von Sunitinib (jeweils 5 μ M) inkubiert, bevor jeweils 50 μ g Protein/Bahn mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und die verschiedenen Proteine unter Verwendung der entsprechenden Antikörper (Anti-HSPA5, Anti-HSPA8, Anti-SPARC und Anti-14-3-3 zeta/Delta (Cell Signaling)) detektiert und anschließend quantifiziert wurden. Die Visualisierung von β -Aktin diente als Ladekontrolle. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm S.D. aus drei unabhängigen Experimenten angegeben (* $p < 0,05$).

Zur Überprüfung, ob diese Daten allgemein für das NZK gültig sind, erfolgte die Wiederholung der Experimente unter Verwendung zweier weiterer NZK-Zelllinien (MZ1795RC, MZ2905RC). Leider zeigte sich, dass Sunitinib die drei Proteine 14-3-3 ζ/δ , SPARC und HSPA8 in den verschiedenen NZK-Zelllinien unterschiedlich reguliert, was die Ableitung allgemein gültiger Biomarker für das Therapieansprechen nahezu unmöglich macht. So lag das im Sekretom von MZ1257RC herunter regulierte Protein 14-3-3 ζ/δ sowohl im Sekretom der MZ1795RC- als auch im Sekretom der MZ2905RC-Zellen hoch reguliert vor. Das im Zellkulturüberstand von MZ1257RC-Zellen deutlich hoch regulierte Protein SPARC wurde zwar auch bei Verwendung von MZ1795RC-Zellen durch Sunitinib hoch reguliert, aber in einem deutlich geringeren Ausmaß. Im Gegensatz dazu, wurde SPARC im Zellkulturüberstand von MZ2905RC-Zellen durch Sunitinib sogar herunter reguliert. Ähnlich lagen die Verhältnisse auch für HSPA8. Das im Zellkulturüberstand von MZ1257RC-Zellen deutlich herunter regulierte HSPA8 wurde zwar auch bei Verwendung von MZ1795RC-Zellen durch Sunitinib herunter reguliert, lag aber im Zellkulturüberstand von MZ2905RC-Zellen durch Sunitinib stark hoch reguliert vor (Abbildung 5.8).

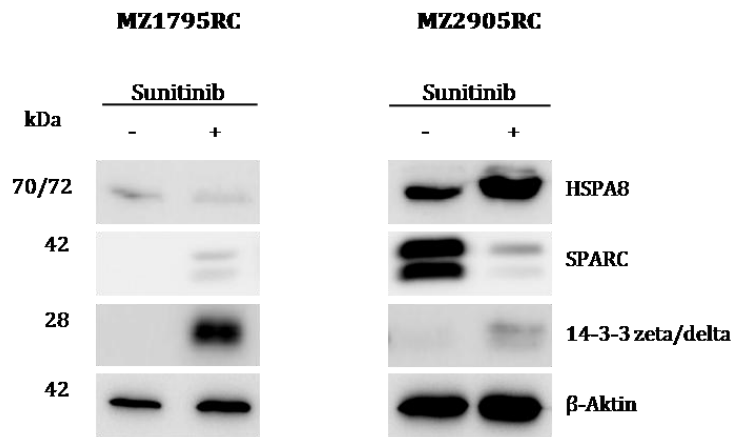


Abbildung 5.8 Western Blot Analysen von SPARC, 14-3-3 zeta/delta und HSPA8 im Sekretom von MZ1795RC und MZ2905RC

Die Zellen wurden für 72 h in Ab- bzw. Anwesenheit von Sunitinib (jeweils 5 μ M) inkubiert, bevor jeweils 50 μ g Protein/Bahn mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und die verschiedenen Proteine unter Verwendung der entsprechenden Antikörper (Anti-HSPA5, Anti-HSPA8, Anti-SPARC und Anti-14-3-3 zeta/Delta (Cell Signaling)) detektiert und anschließend quantifiziert wurden. Die Visualisierung von β -Aktin diente als Ladekontrolle.

5.1.5 Sunitinib-vermittelte Veränderungen der Proteinfaltungsmaschinerie

Die Analyse des Proteoms zeigte, dass Chaperone häufig von der Behandlung mit Sunitinib beeinflusst werden. Daher wurden einige Vertreter dieser Proteinfamilie im *Western Blot* näher untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.9 und 5.10 dargestellt. Die NZK Zellenlinien MZ1257C, MZ1795RC und MZ2905RC wurden 72 h mit 5 μ M Sunitinib behandelt, anschließend aufgeschlossen und die Proteine extrahiert. Untersucht wurden sowohl die Hitzeschock-Proteine HSP40, 60, 70 und 90 als auch PDI, HSPA5, HSF1, und Calnexin. Das Glukose-regulierte Protein 78 (HSPA5) und HSP90 wurden intrazellulär unter Sunitinib-Behandlung in allen drei Modell-Zelllinien herunter reguliert. Dies trifft auch für HSP40 und 70 zu. Calnexin, ein Protein, das Kalzium-abhängig an der Faltung und korrekten Glykosylierung von zu sekretierenden Proteinen beteiligt ist, ist das einzige Protein, das unter Sunitinib-Behandlung hochreguliert vorlag. Dies deutet auf eine verstärkte Sekretion von Proteinen hin. Die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) sowie *heat shock factor 1* (HSF1) sind nur in zwei von drei Modell-Zelllinien signifikant reguliert. Sie zeigten jedoch beide eine Tendenz zur Herunterregulation. Die PDI ist essentiell für die richtige Disulfid-Verbrückung von Proteinen. Ist diese gestört, ist eine korrekte Faltung nicht möglich. Die Menge an ungefalteten Proteinen nimmt zu und das Gleichgewicht wird zu Gunsten der Apoptose verschoben. Der Transkriptionsfaktor HSF1 ist notwendig, um die Translation von HSP-Genen bei der *unfolded protein response* (UPR) zu beschleunigen. Die UPR soll bei Stressbedingungen eine Normalisierung des Proteinhaushaltes wiederherstellen. Dies geschieht durch eine Anpassung der Translation zu Gunsten von Chaperonen und den verstärkten Abbau falschgefalteter Proteine. Führt dies nicht zum Abbau des durch Proteinstau verursachten Zellstresses, wird die Apoptose eingeleitet. Die gemessene Herunterregulation von HSF1 und PDI begünstigt damit eine Verschiebung hin zum Absterben der Zelle, auf Grund eines zu hohen Aufkommens an ungefalteten Proteinen und einer unzureichenden Translation von HSP Genen.

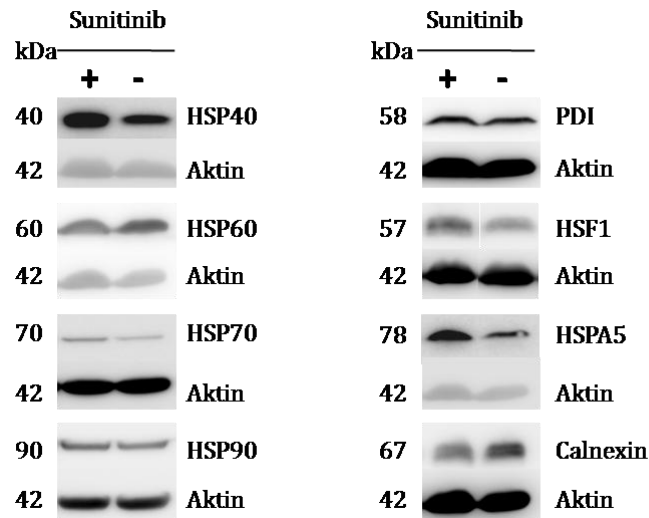


Abbildung 5.9 intrazelluläre *Western Blot* Analysen zur Synthese verschiedener Hitzeschock Proteine in MZ1257RC

Die Zellen wurden für 72 h in Ab- bzw. Anwesenheit von Sunitinib (jeweils 5 μ M) inkubiert, bevor jeweils 50 μ g Protein/Bahn mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und die verschiedenen Proteine unter Verwendung der entsprechenden Antikörper (HSP/Chaperone Antibody Sampler Kit (Cell Signaling)) detektiert und anschließend quantifiziert wurden. Die Visualisierung von β -Aktin diente als Ladekontrolle.

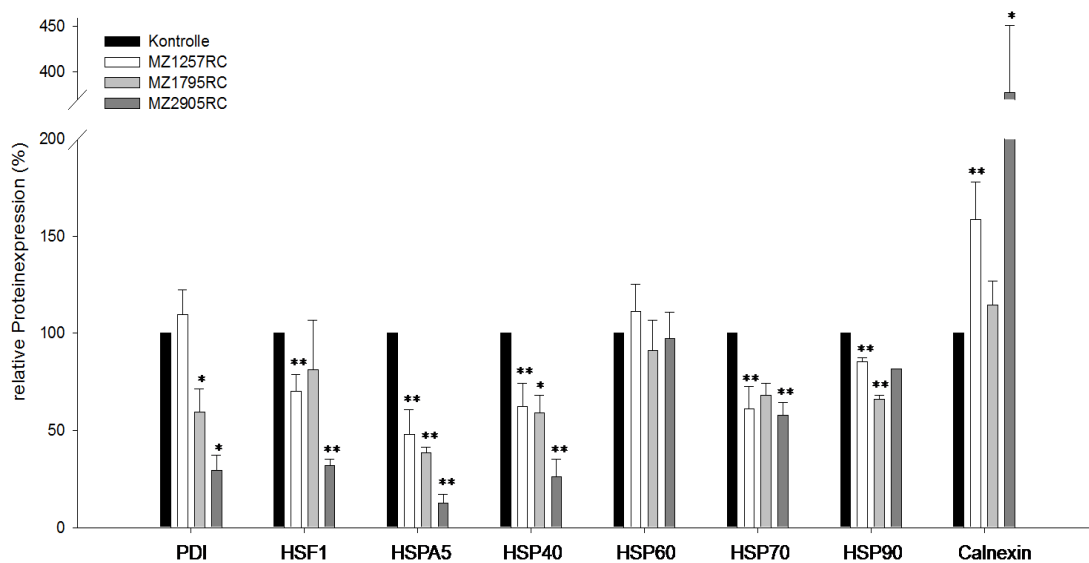


Abbildung 5.10 *Western Blot* Analysen zur Synthese von Hitzeschock Proteine.

MZ1257RC, MZ1795RC und MZ2905RC wurden für 72 h in Ab- bzw. Anwesenheit von Sunitinib (jeweils 5 μ M) inkubiert, bevor jeweils 50 μ g Protein/Bahn mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und die verschiedenen Proteine unter Verwendung der entsprechenden Antikörper (HSP/Chaperone Antibody Sampler Kit (Cell Signaling)) detektiert und anschließend quantifiziert wurden. Die Visualisierung von β -Aktin diente als Ladekontrolle. A: SigmaPlot Darstellung der *Western Blot* Daten. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm *S.D.* aus drei unabhängigen Experimenten angegeben (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$).

5.1.6 Zusammenfassung

Für die Modellzelllinie MZ1257RC konnten intrazellulär für die Behandlung mit physiologischen Konzentrationen der untersuchten TKI Sorafenib, Sunitinib und Axitinib nur für Sorafenib-Behandlung regulierte Proteine identifiziert werden. Dies ist unter anderem dem Umstand geschuldet, dass nur hochabundante Proteine mit der 2D-DIGE Methode nachgewiesen werden können. Die höhere Anzahl an extrazellulär reguliert identifizierten Proteinen weist darauf hin, dass die Wirkung der TKI verstärkt im extrazellulären Raum der Tumorzellen erfolgt. Es war jedoch nicht möglich, mit der Untersuchung des Proteoms bzw. Sekretoms potentielle Biomarker für alle 3 untersuchten Zelllinien zu identifizieren. Der Versuch einer Verifizierung durch *Western Blot* Analysen zeigte immer wieder unterschiedliche Regulationsmuster. Die Ergebnisse ließen zusammen mit den Voruntersuchungen zur Wirksamkeit der TKI jedoch Rückschlüsse auf verstärkt regulierte Stoffwechselwege der Zelle, wie Apoptose und Proteinfaltung, zu. Gezielte *Western Blot* Analysen ermittelten für die drei untersuchten NZK Zelllinien MZ1257RC, MZ1795RC und MZ2905RC Survivin und Mcl-1 als potentielle Biomarker für die Untersuchung des Therapieverlaufs für alle drei untersuchten TKI. Für die Untersuchung des Therapieverlaufs von Sunitinib, konnten für alle drei Zelllinien Stat3, HSP40 und HSPA5 als mögliche Biomarker identifiziert werden.

5.2 Wirkung der Tyrosinkinaseinhibitoren auf Immunzellen

Da von der Behandlung mit TKIs nicht nur die Tumorzellen allein betroffen sind, sondern unter anderem auch die Immunzellen des Tumormikromilieus, wurden Effekte der verwendeten TKI Sunitinib, Sorafenib und Axitinib auf frisch isolierte mononukleäre Zellen aus gesundem Spenderblut (PBMCs) bzw. T-Zellen untersucht.

5.2.1 Wirkung von TKIs auf die Viabilität und Proliferation von Immunzellen

Zunächst sollte die Wirkung von TKIs auf die Proliferation von Immunzellen untersucht werden. Dafür wurden stimulierte PBMCs sowie Jurkat-Zellen (als Modellzelllinie für T-Zellen) mit unterschiedlichen Konzentrationen (PBMCs: 0-20 μM ; Jurkat: 0-50 μM) an TKI behandelt, die Zellen mit CFSE (5,6-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester) nach Angaben des Herstellers markiert und nach sechs Tagen durchflusszytometrisch vermessen. Abbildung 5.11 zeigt, dass alle drei verwendeten TKI sowohl bei PBMCs (Abbildung 5.11 A) als auch bei Jurkat-Zellen (Abbildung 5.11 C) die Proliferation vollständig hemmen.

Um zu ermitteln, ob die verwendeten TKI zusätzlich einen Einfluss auf die Viabilität von Immunzellen haben, wurden PBMCs aus gesundem Spenderblut sowie Jurkat-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen (PBMCs: 0-20 μM ; Jurkat: 0-50 μM) an TKI behandelt und nach 72 h die Viabilität mittels XTT-Assay bestimmt. Die PBMCs wurden zusätzlich mit Okt3 und CD28 stimuliert. Abbildung 5.11 zeigt die TKI-induzierte Abnahme der metabolischen Aktivität der PBMCs (Abbildung 5.11 B). Die Hemmung der Viabilität in Anwesenheit der verschiedenen TKI erfolgt jedoch unvollständig. In Anwesenheit von Sunitinib und Sorafenib bleibt eine metabolische Restaktivität von 20 % erhalten, wohingegen die Viabilität aktivierter PBMCs durch Axitinib nur geringfügig beeinflusst wird. Ein ähnlicher Effekt wurde in Anwesenheit von Axitinib auch bei der Verwendung von Jurkat-Zellen detektiert (Abbildung 5.11 D). Dabei zeigte sich ein zweiphasiger Verlauf, an dessen Ende selbst bei hohen Konzentrationen eine metabolische Restaktivität von 20 % erhalten blieb. Sunitinib und Sorafenib hemmen die metabolische Aktivität von Jurkat-Zellen hingegen vollständig.

Aus diesen Daten konnten für die drei verwendeten TKI IC_{50} -Werte berechnet werden, die in Tabelle 5.6 zusammengefasst sind. Diese liegen für Sunitinib 30- bis 60-fach und für Axitinib 3-fach (Phase 1) bis 100-fach (Phase 2) höher als die im Plasma ermittelten Konzentrationen nach Verabreichung der Standarddosis (**Sunitinib**: 50 mg pro Tag über 4 Wochen gefolgt von 2 Wochen Pause; **Sorafenib**: 400 mg zweimal täglich; **Axitinib**: 5 mg zweimal täglich) zur Behandlung des fortgeschrittenen NZK. Die in der Literatur beschriebenen physiologischen Plasmakonzentrationen bei Standarddosierung liegen für Sunitinib zwischen: 0.06 und 0.1 μM , für Sorafenib zwischen 15 und 20 μM und für Axitinib zwischen 0.1 und 0.2 μM . Demnach stimmen allein die *in vitro* ermittelten IC_{50} -Werte von Sorafenib mit den tatsächlich unter Therapie vorliegenden physiologischen Plasmakonzentrationen überein. Die Versuche zu Proliferation und Viabilität wurden unter Verwendung der physiologischen Konzentrationen wiederholt, zeigten jedoch für Sunitinib und Axitinib erwartungsgemäß keinen Einfluss (Abbildung 5.11).

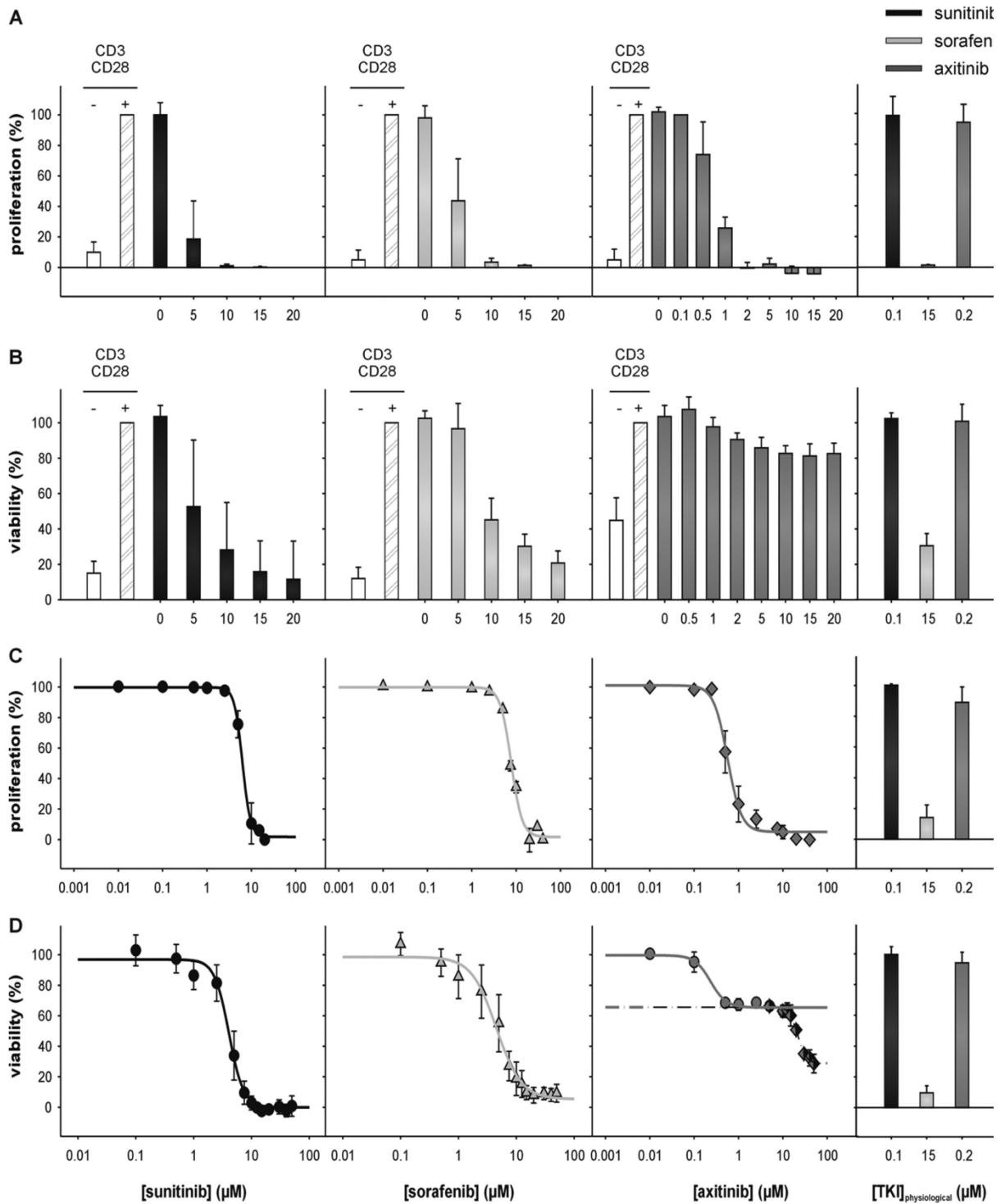


Abbildung 5.11 TKI-vermittelte Hemmung der Proliferation und Viabilität von Immunzellen

Nach der Inkubation von Okt3 / CD28-stimulierten PBMC (A, B) oder unstimulierten Jurkat-Zellen (C, D) mit steigenden TKI-Konzentrationen (0-20 μM für PBMC, 0-50 μM für Jurkat) für 6 Tage bzw. 72 Stunden erfolgte die Analyse der Zellproliferation CFSE-markierter Zellen mittels Durchflusszytometrie (A, C) bzw. die Analyse der Zellviabilität mittels XTT-Test (B, D). Die Daten geben den Mittelwert \pm Standardabweichung an; A/B: n = 5; C/D n = 3.

Tabelle 5.6 Zusammenfassung antiproliferativer und zytotoxischer Effekte der verwendeten TKI auf aktivierte PBMC und Jurkat-Zellen

Zellart	TKI	IC50-Wert \pm SD (μM)	
		Proliferation	Viabilität
PBMC	Sunitinib	2,9 \pm 0,2	5,4 \pm 0,5
	Sorafenib	4,7 \pm 0,3	8,5 \pm 0,4
	Axitinib	0,7 \pm 0,1	1,7 \pm 0,4 (Phase 1)
Jurkat	Sunitinib	6,4 \pm 0,9	3,7 \pm 0,5
	Sorafenib	7,8 \pm 0,3	5,2 \pm 1,0
	Axitinib	0,6 \pm 0,1	0,18 \pm 0,01 (Phase 1) 21,4 \pm 0,4 (Phase 2)

5.2.2 Immunmodulatorische Effekte von TKI

Da der Einfluss der drei Wirkstoffe auf die Zusammensetzung der Immunzellpopulation sowie im Speziellen auf die Stimulation humaner T-Zellen noch weitestgehend unverstanden ist, sollten die Effekte der TKI auf die Zusammensetzung von Immunzell-Subpopulationen und die Expression immunmodulatorischer Proteine untersucht werden. Dies erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analysen an unstimulierten und stimulierten PBMCs, unter Verwendung von Antikörpern, die gegen unterschiedliche Subpopulationen sowie Aktivitätsmarker humaner T-Zellen gerichtet sind. Das verwendete Antikörperpanel ist in Tabelle 5.7 zusammengefasst. Die PBMCs wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des jeweiligen TKI für 72 h behandelt (Sunitinib: 0,1 μM und 5 μM ; Sorafenib: 5 μM ; Axitinib: 0,2 μM und 5 μM) und durchflusszytometrisch analysiert.

Abbildung 5.12 A zeigt, dass Sorafenib den Anteil an zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen reduziert, wohingegen die modulatorischen CD4⁺ T-Zellen in ihrer Zahl nicht beeinflusst werden. Die Differenzierungsmarker CXCR3 (Chemokinrezeptor), CD26 (Dipeptidyl-Peptidase IV) und CCR7 (C-C-Motiv Chemokinrezeptor 7) werden unter Sorafenib-Behandlung sowohl auf CD8⁺ als auch auf den CD4⁺ T-Zellen herunter reguliert. Die Aktivierungsmarker CD26 und CD69 sind auf NK-Zellen ebenfalls herabgesetzt. Im Gegensatz dazu führte die Axitinib-Behandlung nicht zu signifikanten Effekten. Axitinib beeinflusste weder die Zusammensetzung der Immunzellpopulation noch die Expression der untersuchten Proteine. Selbiges gilt für die Verwendung von physiologischen Sunitinib-Konzentrationen. Höhere Sunitinib-Konzentrationen konnten unter Verwendung des in Tabelle 5.7 dargestellten Antikörperpanels nicht verwendet werden, da es aufgrund seiner starken Eigenfluoreszenz mit den konjugierten Fluoreszenz-Farbstoffen interferierte.

Tabelle 5.7 verwendetes Antikörperpanel für die Durchflusszytometrie

(Wenn nicht anderweitig gekennzeichnet, wurden Antikörper von BD Biosciences verwendet)

Tube	Fluoreszenzkonjugierte monoklonale Antikörper						
	FITC	PE	PerCP	PE-Cy7	APC	APC-H7	V450
1	IgG1	IgG1	CD3	CD8	IgG1	CD4	CD45 ^a
2	CD45RA	CCR7 ^b	CD3	CD8	CD28	CD4	CD45 ^a
3	PD1	ICOS	CD3	CD8		CD4	CD45 ^a
4	CD26	CD69	CD3	CD8	CD56	CD4	CD45 ^a
5	CD57	CD45RO	CD3	CD8	CD56	CD4	CD45 ^a
6	CXCR3 ^b	HLA-DR	CD3	CD8	CTLA4	CD4	CD45 ^a
7	IgG1	IgG2a rat ^c		CD8	IgG1	CD4	CD45 ^a
8	CD25	FOXP3 ^c		CD8	INF γ ^a	CD4	CD45 ^a
9	IgG1	IgG2b ^c	IgG1 (PE-Cy5) ^d	CD8	CD3	CD4	CD45 ^a
10	CD3 ζ	Perforin ^c	CD3 ϵ (PE-C5) ^d	CD8	CD3	CD4	CD45 ^a
11		IgG1		CD8	CD3	CD4	CD45 ^a
12		IL-4		CD8	CD3	CD4	CD45 ^a

a Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)

b R&D Systems (Abingdon, UK)

c eBioscience (Frankfurt)

d Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)

Der Effekt von Sunitinib auf immunsupprimierende regulatorische T-Zellen (CD4+ CD25+ FoxP3+) wurde deshalb wiederholt, wobei die Auswahl der entsprechenden Fluoreszenzmarkierten Antikörper optimiert wurde. Abbildung 5.12 B zeigt, dass sowohl Sunitinib als auch Sorafenib in einer Konzentration von 5 μ M einen negativen Effekt auf regulatorische T-Zellen (Treg) haben, da beide Wirkstoffe die Anzahl an nachweisbaren Tregs reduziert. Im Gegensatz dazu konnte für Axitinib kein Effekt auf die Treg-Subpopulation detektiert werden. Weiterführend erfolgte die Analyse der TKI-vermittelten Effekte auf die Interferon γ (IFN γ)-Produktion, einem wichtigen Aktivator für Makrophagen. Physiologische Sunitinib- und Axitinib-Konzentrationen hatten keinen Einfluss auf die IFN γ -Produktion, wohingegen höhere Konzentrationen an Sunitinib (5 μ M) die IFN γ -Produktion erheblich reduzierte (Abbildung 5.12 C). Sorafenib reduziert die IFN γ -Produktion ebenfalls, wohingegen Axitinib die IFN γ -Produktion nicht beeinflusst.

Während der Immunzellaktivierung treten auf der Zelloberfläche aktivierter T-Zellen verschiedene Aktivierungsmarker auf. Zur Analyse, ob und inwieweit die TKI die Aktivierung humaner T-Zellen unterdrücken, erfolgte die Analyse der TKI-abhängigen Oberflächenexpression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69. Hierfür wurden frisch isolierte PBMCs mit PHA-M stimuliert und die Oberflächenexpression von CD25 und CD69 in Ab- und Anwesenheit der TKI (0,1 μ M/5 μ M Sunitinib, 5 μ M Sorafenib, 0,2 μ M/5 μ M Axitinib) durchflusszytometrisch untersucht. *Cluster of Differentiation 69* (CD69) wird bereits wenige Stunden nach der Immunzellaktivierung auf T- und NK-Zellen exprimiert. Der Interleukin-2-Rezeptor (CD25) wird dagegen erst 1-2 Tage nach einer Aktivierung auf der Zelloberfläche nachweisbar und zwar solange die Interleukin 2 Sezernierung als Ergebnis der Aktivierung anhält. Im Gegensatz zu Axitinib, inhibieren Sunitinib und Sorafenib die Expression beider Aktivierungsmarker und hemmen demnach die T-Zell-Aktivierung im Rahmen der Immunantwort. CD25 wird bereits bei physiologischen Sunitinib-Konzentrationen herunter reguliert, wohingegen die Expression von CD69 erst bei höheren Sunitinib-Konzentrationen negativ beeinflusst wird. Da Axitinib selbst bei höheren Konzentrationen keinen Effekt auf die Immunzellaktivierung hatte, scheint dieser Wirkstoff die Immunantwort nicht negativ zu beeinflussen (Abbildung 5.13).

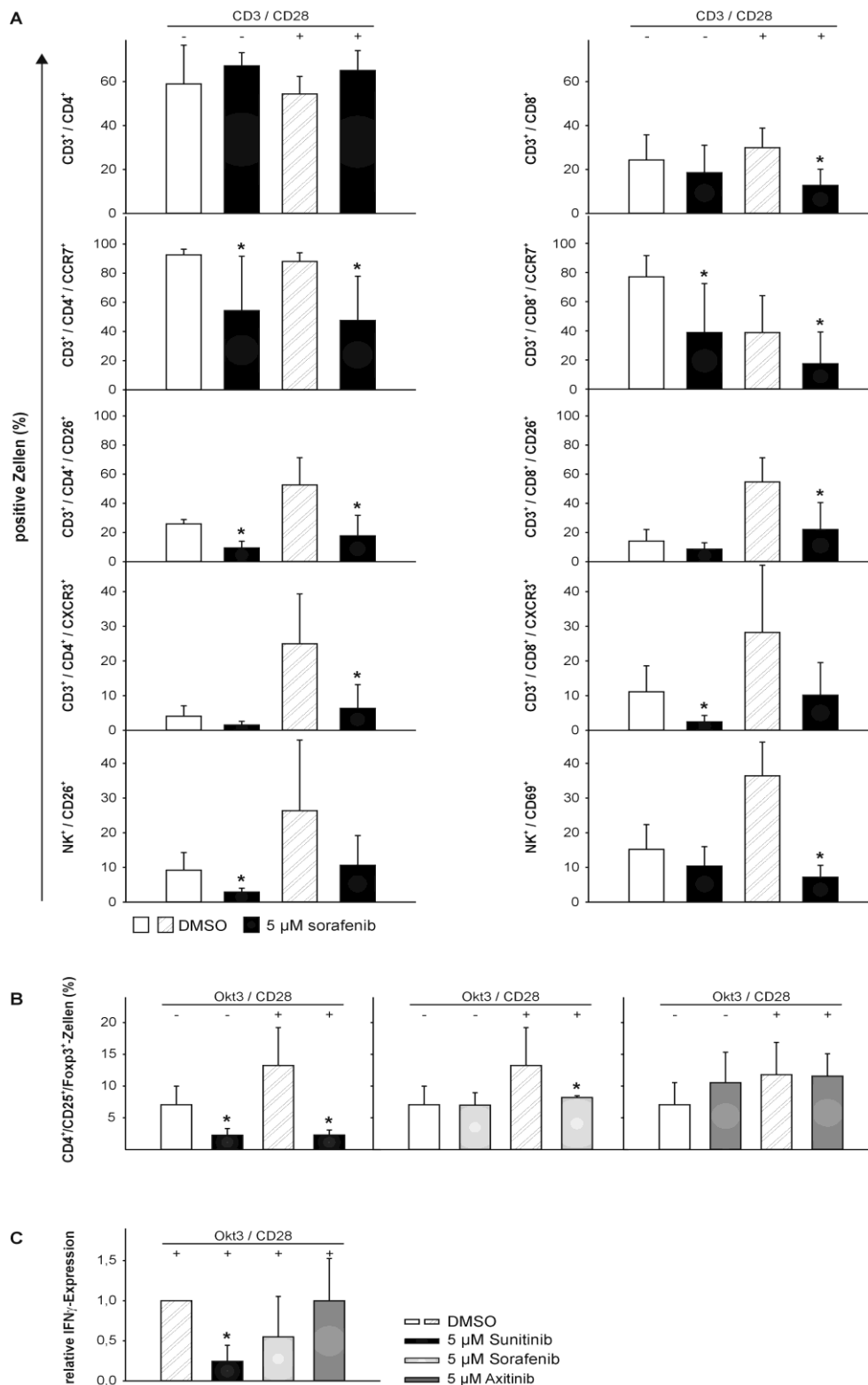


Abbildung 5.12 Sorafenib-vermittelte Reduktion verschiedener Immunzellsubpopulationen / spezifischer Immunzellmarker

Gezeigt ist die Sorafenib-induzierte (5 μ M, 72 Stunden) Herunterregulation verschiedener Aktivierungsmarker von Okt3/CD28-stimulierten PBMC (A). Die Färbung erfolgte unter Verwendung des in Tabelle 5.7 aufgeführten Antikörperpanels nach den Protokollen der Hersteller. Nach Fixierung und intrazellulärer Färbung erfolgten die Bestimmung der Frequenz von Treg (B) sowie die Analyse der IFN γ -Produktion (C). Die Daten geben den Mittelwert \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Versuchen an ($\star = p < 0,05$).

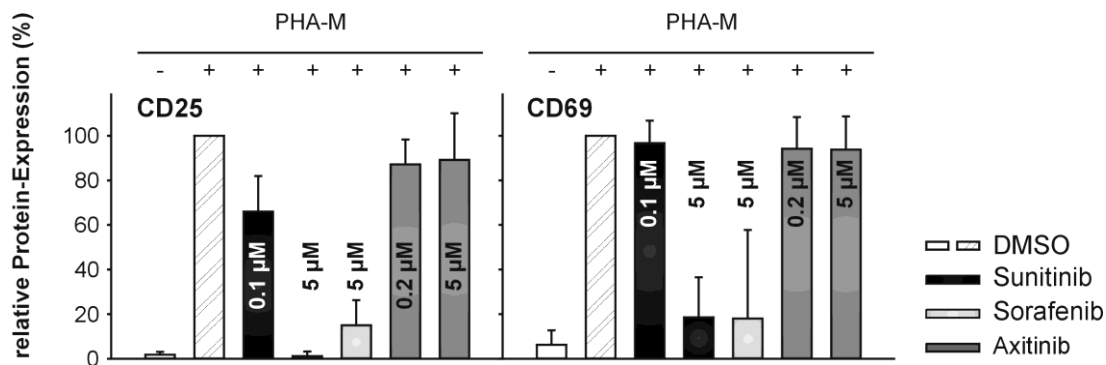


Abbildung 5.13 Inhibierung der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 durch Sunitinib und Sorafenib.

Dargestellt ist die Inhibierung der Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 Sunitinib- bzw. Sorafenib-behandelter PBMCs (0,1 μM/5 μM Sunitinib, 5 μM Sorafenib, 0,2 μM/ 5 μM Axitinib; 72 Stunden; PHA-M-Stimulation). Die Färbung erfolgte unter Verwendung der in Tabelle 5.7 aufgeführten Antikörper nach dem Protokoll der Hersteller. Die Daten geben den Mittelwert ± Standardabweichung von fünf unabhängigen Versuchen an.

5.2.3 TKI-vermittelte Induktion von Apoptose in T-Zellen

Im Folgenden wurde untersucht, inwieweit die TKI die Apoptose von T-Zellen induzieren. Die Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen erfolgte durchflusszytometrisch mittels Färbung mit APC-konjugiertem Annexin V und 7AAD. Da zu Beginn der Apoptose Phosphatidylserin vom Zellinneren auf die Außenseite der Membran transloziert, kann mittels Annexin V, welches am Phosphatidylserin bindet, die frühe Phase der Apoptose verfolgt werden. 7AAD hingegen interkaliert in die im Zellkern vorliegende DNA und kann erst nach Verlust der Membranintegrität an diese binden. Die Färbung mit 7AAD erfolgt demnach erst in der späten Apoptose oder bei nekrotischen Prozessen. Untersucht wurde die TKI-vermittelte Apoptose-Induktion sowohl unter Verwendung von Jurkat-Zellen als auch von frisch isolierten T-Zellen. Es zeigte sich, dass Jurkat-Zellen sensitiver auf Sunitinib (Apoptose-Induktion ab 7,5 μM Sunitinib) reagieren als auf Sorafenib (Apoptose-Induktion ab 10 μM Sorafenib) (Abbildung 5.14 A), wohingegen die Anwesenheit von Axitinib nicht zur Induktion der Apoptose führte. Für PHA-M stimulierte T-Zellen konnte ebenfalls kein Effekt von Axitinib auf die Induktion der Apoptose nachgewiesen werden (Abbildung 5.14 B), was sehr gut mit den Daten zum Einfluss der TKI auf die Viabilität von T-Zellen übereinstimmt. Weiterhin zeigte sich, dass physiologische Sunitinib-Konzentrationen ebenfalls keine Apoptose induzieren. Im Gegensatz zu Axitinib führen höhere Sunitinib-Konzentrationen, ähnlich wie Sorafenib, jedoch dennoch zur Apoptose-Induktion (Abbildung 5.14 B).

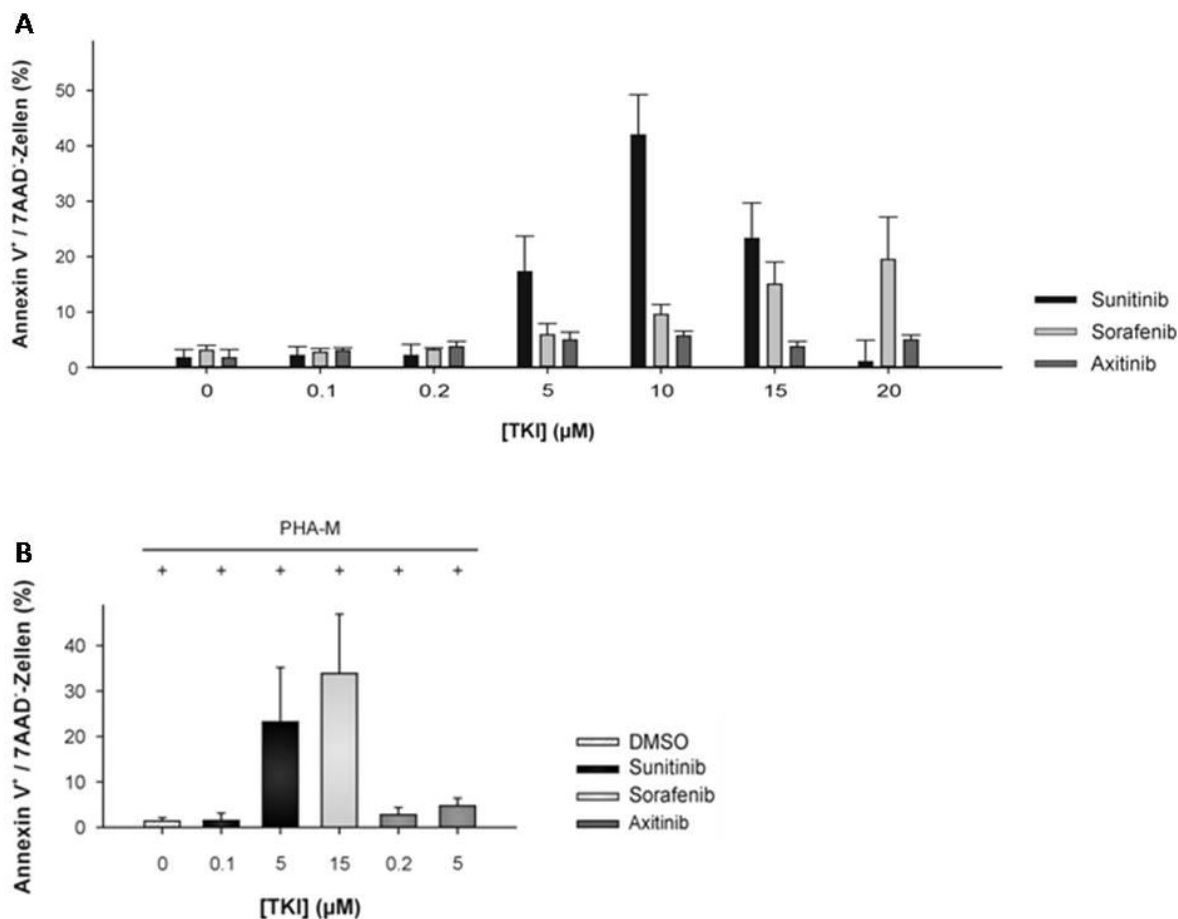


Abbildung 5.14 TKI-induzierte Apoptose von Jurkat-Zellen und frisch isolierten T-Zellen.

Die Inkubation der Zellen (A: Jurkat- bzw. B: frisch isolierte, PHA-M-stimulierte T-Zellen) erfolgte in Ab- und Anwesenheit der TKI (Jurkat: 0-20 µM; T-Zellen: ,1 µM/5 µM Sunitinib, 15 µM Sorafenib, 0,2 µM/ 5 µM Axitinib) für 72 Stunden. Die Daten geben den Mittelwert ± Standardabweichung aus vier unabhängigen Versuchen an. Die quantitative Analyse der TKI-induzierten Apoptose erfolgte durchflusszytometrisch mittels APC-Annexin V/7AAD-Färbung.

Neben dem Nachweis von früh-apoptotischen Zellen unter Verwendung der Annexin V / 7AAD-Färbung wurde die TKI-vermittelte Induktion der Apoptose von T-Zellen weiterführend durch den Nachweis von aktiver Caspase 3 analysiert. Caspase 3 wird sowohl im intrinsischen als auch im extrinsischen Apoptoseweg aktiviert und markiert den Punkt, an dem die Zelle die Apoptose nicht mehr stoppen kann. Die Aktivierung der Caspase 3 wurde mit Hilfe des *FITC Active Caspase-3 Apoptosis Kit* (BD Pharmingen™) durchflusszytometrisch detektiert. Dabei zeigte sich, dass Axitinib die Caspase 3 ab einer Konzentration von 5 µM aktiviert. Die Aktivierung der Caspase 3 erfolgte nach der 72-stündigen Inkubation in Anwesenheit von Axitinib, also zu einem Zeitpunkt, an dem mittels Annexin V / 7AAD-Färbung noch keine frühapoptotischen Zellen nachweisbar waren (Abbildung 5.14). In Jurkat-Zellen überstieg zu diesem Zeitpunkt der Anteil an aktiver Caspase 3 mit etwa 25 % positiv getesteten Zellen sogar den Anteil an positiven Zellen, der in Anwesenheit von Sunitinib und Sorafenib detektiert wurde (Abbildung 5.15 A). In frisch isolierten T-Zellen, ist der Anteil an positiv auf aktive Caspase 3 getesteten Zellen vergleichbar mit den Daten, die unter Verwendung von Jurkat-Zellen generiert wurden. In ca. 15 % der Zellen wurde aktive Caspase 3 nachgewiesen. Axitinib beeinflusst T-Zellen hingegen weniger, nur ca. 7,5 % der Zellen beinhalten aktive-Caspase 3 (Abbildung 5.15 B). Diese Daten

deuten darauf hin, dass in Anwesenheit von Axitinib die Apoptose der T-Zellen zeitlich verzögert induziert wird. Während in Anwesenheit von Sunitinib und Sorafenib nach 72 Stunden bereits früh-apoptotische Zellen und aktive Caspase 3 nachweisbar waren, konnte in Anwesenheit von Axitinib nur Caspase 3 nachgewiesen werden. In der Endkonsequenz wird also auch von Axitinib in T-Zellen Apoptose induziert, das Fehlen frühapoptotischer Zellen nach einer Axitinib-Inkubation von 72 Stunden lässt aber unterschiedliche Apoptose-Wege vermuten.

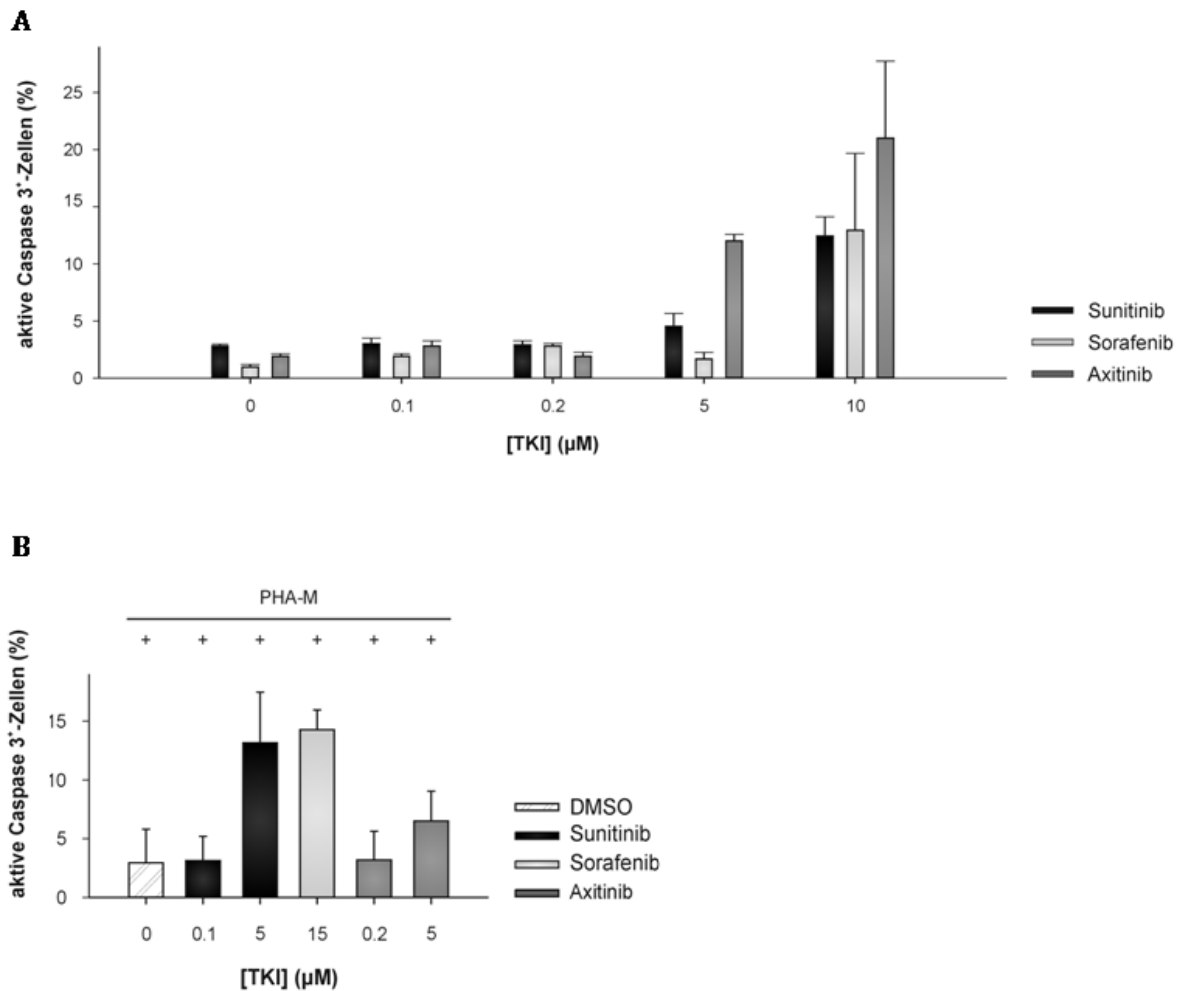


Abbildung 5.15 TKI-abhängige Caspase-3-Aktivierung in Jurkat-Zellen und frisch isolierten T-Zellen

Die Inkubation der Jurkat-Zellen (A) bzw. frisch isolierten, PHA-M-stimulierten T-Zellen (B) erfolgte in Ab- und Anwesenheit der TKI (0 – 20 μM) für 72 Stunden. Die Detektion der aktiven Caspase-3 erfolgte durchflusszytometrisch unter Verwendung des *FITC Active Caspase-3 Apoptosis Kit* nach dem Protokoll des Herstellers (BD Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland). Die Daten geben den Mittelwert \pm Standardabweichung von vier unabhängigen Versuchen an.

Zur weiterführenden Detektion von mechanistischen Unterschieden bei der TKI-vermittelten Induktion der Apoptose, erfolgte die Analyse der Aktivität der Caspasen 8 und 9 in Ab- und Anwesenheit der verschiedenen TKI.

Zur Analyse, ob die TKI die Apoptose über den intrinsischen (Caspase 9) oder den extrinsischen (Caspase 8) Weg auslösen, erfolgte die Analyse der Aktivität beider Caspasen in Ab- und Anwesenheit der verschiedenen TKI unter Verwendung von Jurkat-Zellen. Nach einer Inkubation von 72 h mit unterschiedlichen TKI-Konzentrationen (0-20 μM) erfolgte ein

Aktivitätstest unter Verwendung des *Caspase-Glo® 8* bzw. *Caspase-Glo® 9 Assay Systems* (Promega). Abbildung 5.16 zeigt die Aktivierung der Caspasen 8 und 9 in Abhängigkeit von der TKI-Konzentration. Der Einfluss von Sunitinib auf die Aktivität der Caspasen 8 und 9 konnte nur bis zu einer Konzentration von 10 μM gemessen werden, da die hohe Eigenfluoreszenz die Messung störte.

Axitinib führt bei beiden Caspasen bei einer Konzentration von 5 μM zu einer starken Aktivierung. Der Axitinib-vermittelte Effekt ist jedoch im Gegensatz zu Sunitinib und Sorafenib bei höheren Axitinib-Konzentrationen rückläufig. Die starke Aktivierung der Caspasen 8 und 9 stimmt mit den Daten zur Caspase 3 Aktivierung sehr gut überein. Eine Axitinib-Behandlung führt ebenfalls bereits bei einer Konzentration von 5 μM zur Aktivierung von Caspase 3. Im Gegensatz dazu erhöht die Anwesenheit von Sunitinib und Sorafenib die Aktivität beider Caspasen in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration, allerdings in einem geringeren Ausmaß als Axitinib. Zusammenfassend fällt jedoch auf, dass beide Caspasen durch die TKI in einem ähnlichen Ausmaß aktiviert werden, wodurch keine eindeutige Zuordnung zu einem Apoptoseweg getroffen werden konnte. Bei verstärkter Aktivierung der Caspase 9 wäre die TKI-vermittelte Apoptose-Induktion mittels des intrinsischen Apoptoseweges wahrscheinlich gewesen.

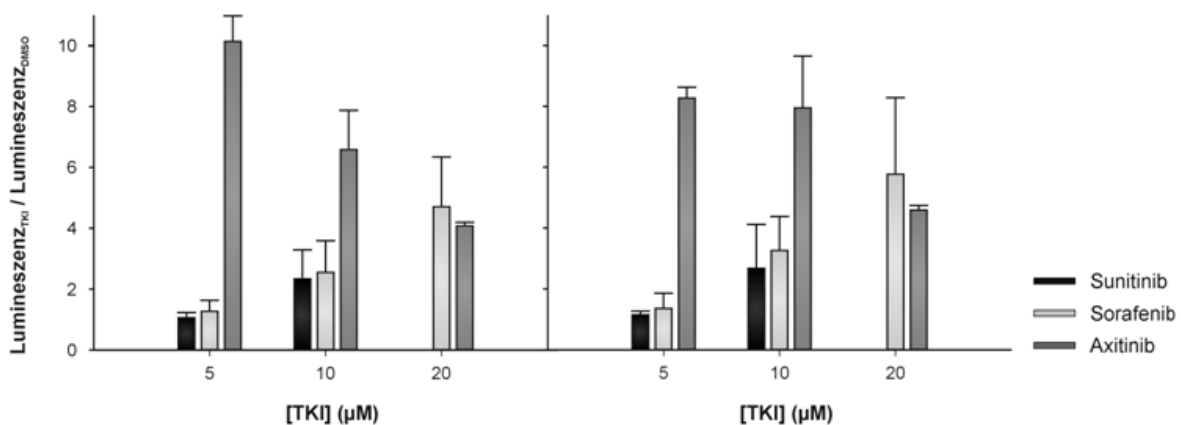


Abbildung 5.16 TKI-abhängige Aktivierung der Caspasen 8 und 9

Die Inkubation der Jurkat-Zellen erfolgte in Ab- und Anwesenheit der TKI (0 – 20 μM) für 72 Stunden. Die Bestimmung der Caspase-8 (A) und -9 (B)-Aktivität erfolgte unter Verwendung des *Caspase-Glo® 8* bzw. *Caspase-Glo® 9 Assay Systems* nach dem Protokoll des Herstellers (Promega, Mannheim, Deutschland). Die Daten geben den Mittelwert \pm Standardabweichung von vier unabhängigen Versuchen an.

Um eine Zuordnung der TKI-induzierten Apoptose zum extrinsischen oder intrinsischen Apoptoseweg vornehmen zu können, wurde weiterhin der Einfluss der verschiedenen TKI auf das mitochondriale Membranpotential analysiert. Dafür wurden Jurkat-Zellen und frisch isolierte T-Zellen mit ansteigenden TKI-Konzentrationen (0-10 μM) für 72 h behandelt und anschließend die TKI-induzierten Veränderungen im Membranpotential mittels *MitoProbe™ JC-1 Assay Kit for Flow Cytometry* (Molecular Probes) analysiert. In gesunden Zellen formt JC-1 ein Aggregat (rot). Bricht das Membranpotential aufgrund von apoptotischen Veränderungen in der Zelle zusammen, kommt es zu einer Grün-Verschiebung, da JC-1 in seine monomere Form (grün) übergeht. Abbildung 5.17 zeigt das Verhältnis der Fluoreszenzsignale aus FL1 (JC-1 Monomere, grün) und FL2 (J-Aggregate, rot). Aus Abbildung 5.17 wird deutlich, dass Axitinib das mitochondriale Membranpotential unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht

negativ beeinflusst. Selbst bei höheren Axitinib-Konzentrationen ist kein Anstieg der grünen Fluoreszenz detektierbar und das Membranpotential bleibt intakt. Im Gegensatz dazu führt die Anwesenheit von Sunitinib und Sorafenib Dosis-abhängig zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, was mit einem Anstieg der grünen Fluoreszenz einhergeht. Diese TKI-induzierten Effekte auf das mitochondriale Membranpotential konnten dabei sowohl unter Verwendung von Jurkat-Zellen als auch bei der Verwendung isolierter T-Zellen aus gesunden Spendern beobachtet werden. Jurkat-Zellen (Abbildung 5.17 A) reagierten deutlich sensitiver auf Sorafenib als auf Sunitinib, wohingegen T-Zellen sensibel auf beide Wirkstoffe reagierten (Abbildung 5.17 B).

Durch den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials in Anwesenheit von Sunitinib und Sorafenib konnte gezeigt werden, dass beide Wirkstoffe die Apoptose durch den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials über den intrinsischen Apoptoseweg initialisieren. Axitinib scheint einen anderen Apoptoseweg zu induzieren (Caspase 3 wird aktiviert), der jedoch erst deutlich zeitverzögert zum Zelltod führt (Viabilitätstest).

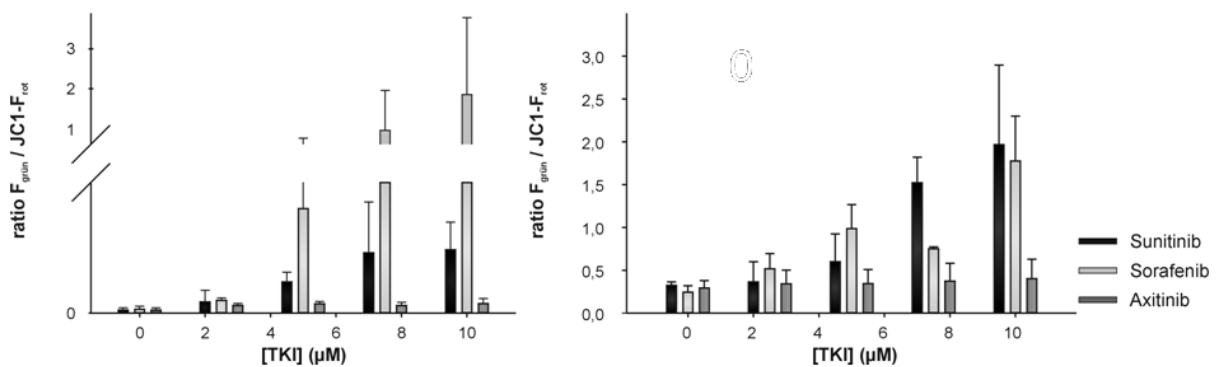


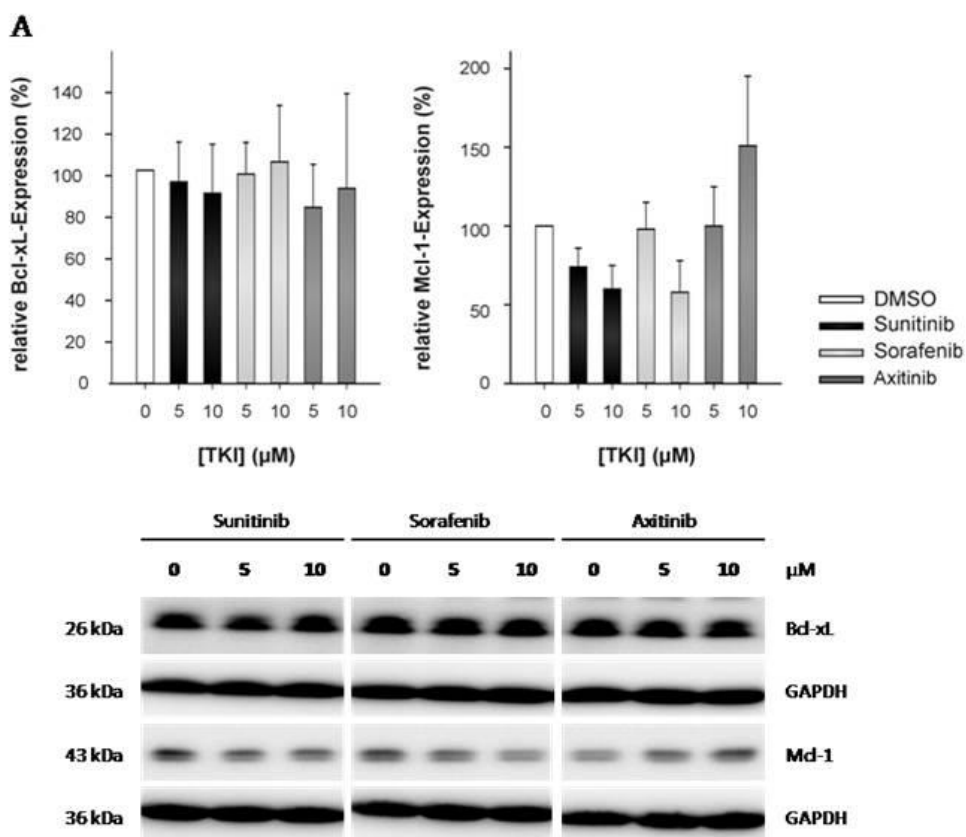
Abbildung 5.17 TKI-abhängiger Verlust des mitochondrialen Membranpotentials

Die Inkubation der Jurkat-Zellen (A) bzw. frisch isolierten, PHA-M-stimulierten T-Zellen (B) erfolgte in Ab- und Anwesenheit der TKI (0 – 10 μM) für 72 Stunden. Gemessen wurde das Verhältnis der Fluoreszenzsignale aus FL1 (JC-1 Monomere, grün) und FL2 (J-Aggregate, rot). Dieses Verhältnis ist direkt vom mitochondrialen Membranpotential abhängig. Dabei gilt, je größer der Wert ist, umso depolarisierter ist das Mitochondrienmembranpotential. Die Daten geben den Mittelwert \pm Standardabweichung von vier unabhängigen Versuchen an.

Der intrinsische Apoptoseweg wird durch verschiedene pro- und anti-apoptotische Proteine der Bcl-2 Familie reguliert. Da unter Axitinib-Behandlung das mitochondriale Membranpotential unter den gewählten experimentellen Bedingungen intakt blieb, ist eine Inhibierung der Depolarisation der Mitochondrienmembran unter Axitinib-Behandlung denkbar. Das anti-apoptotische Protein *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-xL) ist in der Mitochondrienmembran verankert und verhindert die Freisetzung von Cytochrom *c*. Dabei ist das Gleichgewicht zwischen pro-apoptotischen Proteinen (Bax und Bak) und Bcl-xL entscheidend. Dominiert Bcl-xL und wird Bax/Bak nicht von BH3-only Faktoren (z.B. Bim) abgefangen, bleibt das Membranpotential intakt. Ein weiteres Mitglied der Bcl-2 Familie ist das *induced myeloid leukemia cell differentiation protein* (Mcl-1). Seine längste *Splice*-Variante wirkt ebenfalls anti-apoptotisch.

Sowohl Bcl-xL als auch Mcl-1 wurden mittels *Western Blot* hinsichtlich ihrer intrazellulären Konzentration in Jurkat-Zellen und isolierten T-Zellen untersucht (Abbildung 5.18), um eine mögliche Ursache für die Inhibierung der Depolarisation der Mitochondrienmembran unter

Axitinib-Behandlung zu finden. Die Zellen wurden in Ab- und Anwesenheit der TKI (0,5 und 10 μM) für 72 h inkubiert und anschließend im *Western Blot* untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Bcl-xL Expression in Jurkat-Zellen (Abbildung 5.18 A) nicht von der Behandlung mit TKI beeinflusst wird. Das anti-apoptotische Mcl-1 hingegen, wird unter Sunitinib- und Sorafenib-Behandlung herunter reguliert. Im Gegensatz dazu resultiert die Anwesenheit von Axitinib in einer Hochregulation der Mcl-1 Expression und könnte damit die Inhibierung/Verzögerung der Apoptose erklären. Unter Verwendung frisch isolierter T-Zellen ist die Axitinib-induzierte Hochregulation von Mcl-1 sogar noch stärker (Abbildung 5.18 B). Zudem wird auch die Expression von Bcl-xL hoch reguliert. Sunitinib scheint in T-Zellen keinen Einfluss auf die Synthese beider Proteine zu haben, wohingegen Sorafenib die Herunterregulation beider anti-apoptotischen Proteine induziert.



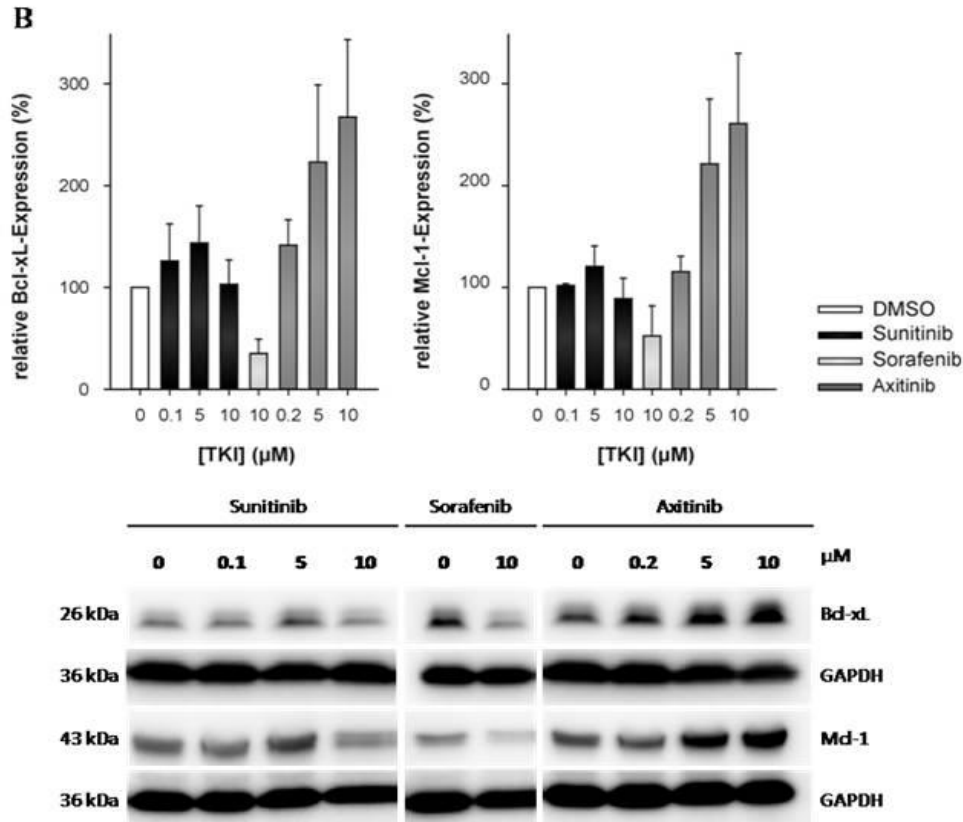


Abbildung 5.18 Axitinib-induzierte Hochregulation anti-apoptotischer Marker.

Die Inkubation der Jurkat- (A) bzw. frisch isolierten, PHA M-stimulierten T-Zellen (B) erfolgte in Ab- und Anwesenheit der TKI (0 – 10 μM) für 72 Stunden. Es wurden jeweils 50 μg Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion von Bcl-xL (Santa Cruz Biotechnology), Mcl-1 und GAPDH (Cell Signaling) erfolgte durch Immunoblotting unter der Verwendung der entsprechenden spezifischen Antikörper. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen *Western Blot* Experimenten. Die *Western Blots* wurden hinsichtlich der Bandenintensitäten quantifiziert. Die Graphen zeigen die Intensitäten der detektierten Banden nach dem Abgleich mit GAPDH als internen Standard. Die Daten geben den Mittelwert ± Standardabweichung drei unabhängigen Versuche an.

5.2.4 Einfluss von TKI auf den Zellzyklus von Immunzellen

Die gesteigerte Expression von Mcl-1 in Axitinib-behandelten Jurkat- und T-Zellen könnte die Inhibierung der Depolarisation der Mitochondrienmembran erklären. Die Menge an Mcl-1 wird innerhalb des Zellzyklus reguliert und schwankt stark innerhalb der verschiedenen Zellzyklusphasen. Während der Mitose erreicht die Mcl-1 Konzentration einen Höhepunkt (Harley et al. 2010). Die starke Mcl-1 Expression in Anwesenheit von Axitinib könnte demnach auf einen Zellzyklusarrest zurückzuführen sein. Zur Untersuchung möglicher TKI-induzierter Veränderungen des Zellzyklus wurden Jurkat-Zellen mit 0,5 μM TKI behandelt und zu definierten Zeitpunkten (0, 8, 12, 24, 36 und 48 h) der Zellzyklus mittels 7AAD-Färbung an präparierten Zellkernen durchflusszytometrisch analysiert. 7AAD interkaliert in die DNA. Die Menge des emittierten Lichts korreliert mit der im Zellkern enthaltenen DNA-Menge. Nach Behandlung mit Sunitinib und Sorafenib konnte kein signifikanter Unterschied zu den gemessenen Zellzyklusphasen im Vergleich zur Kontrolle (DMSO-behandelt) nachgewiesen werden. Die Axitinib-Behandlung hingegen verursachte einen Anstieg der Zahl von Zellen, die sich in der Mitose (G2/M-Phase) befanden (Abbildung 5.19), wodurch ein Axitinib-induzierter Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase nachgewiesen werden konnte.

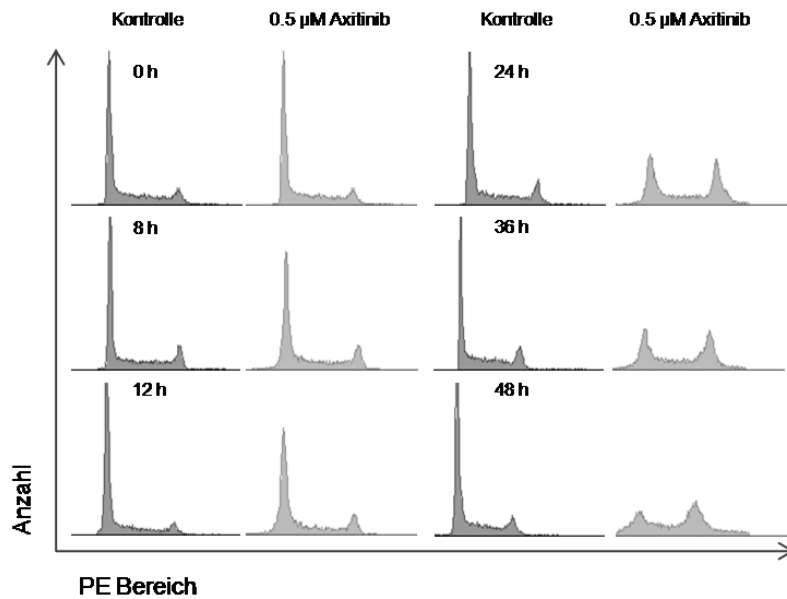


Abbildung 5.19 Axitinib-induzierter Zellzyklusarrest.

Jurkat-Zellen (3×10^5 Zellen in 10 ml Medium) wurden in Ab- und Anwesenheit von $0,5 \mu\text{M}$ Axitinib inkubiert (0-48 Stunden) und anschließend mittels 7AAD-Färbung durchflusszytometrisch analysiert. Die Daten geben den Mittelwert \pm Standardabweichung von vier unabhängigen Versuchen an. Die repräsentativen Durchflusszytometrie-Profile illustrieren die fortschreitende Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus nach 12, 24, 36 und 48 Stunden in Anwesenheit von $0,5 \mu\text{M}$ Axitinib im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle.

Der Axitinib-induzierte G2/M-Zellzyklusarrest wurde durch die Analyse der vorliegenden Menge an mRNA des G2/Mitose-spezifischen Proteins Cyclin B1 weiterführend bestätigt. Der Eintritt in die G2/M-Phase des Zellzyklus ist mit einem Anstieg der Cyclin B1 Konzentration verbunden. Zudem ist eine rückläufige Proteinkonzentration essentiell für das Verlassen dieser Zellzyklusphase. Zur Analyse der Cyclin B1 mRNA wurden Jurkat-Zellen für 48 h mit $5\text{-}10 \mu\text{M}$ TKI behandelt und anschließend die mRNA isoliert. Nach der cDNA Synthese wurde eine qRT-PCR mit Cyclin B1-spezifischen Primern durchgeführt. Im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle zeigte die Anwesenheit von Sunitinib und Sorafenib keinen Effekt auf die Transkription des Cyclin B1 Gens, wohingegen in Anwesenheit von Axitinib eine starke Erhöhung der Cyclin B1 mRNA Konzentration detektiert wurde (Abbildung 5.20). Der Axitinib-induzierte Zellzyklusarrests konnte somit mit zwei verschiedenen Methoden nachgewiesen werden.

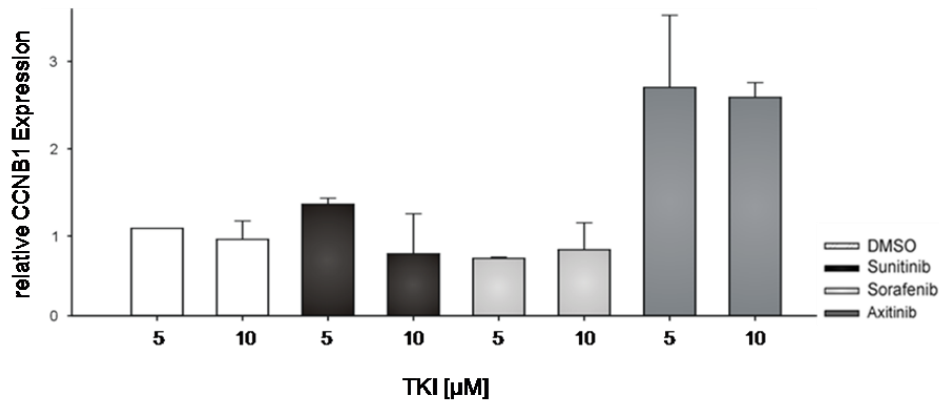


Abbildung 5.20 Axitinib-induzierte Hochregulation der Cyclin B1 Expression.

Die Inkubation der Jurkat-Zellen (3×10^5 Zellen in 10 ml Medium) in Ab- und Anwesenheit der TKI (5-10 µM) erfolgte für 48 Stunden. Die RNA wurde mit Hilfe des Nucleospin Extract Kit (Macherey- Nagel) nach Herstellerangaben isoliert und mittels RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) in cDNA umgeschrieben. Die relative Genexpression von CCNB1 wurde mittels quantitativer *real time* (qRT-) PCR analysiert. Zur Normierung der CCNB1-Expression wurden die Referenzgene HPRT und PPIA verwendet. Die Daten geben den Mittelwert \pm Standardabweichung von vier unabhängigen Versuchen an.

5.2.5 Einfluss von TKI auf das Gesamtproteom von Immunzellen

Um die Wirkung der TKI auf T-Zellen weiterführend zu analysieren, erfolgte die Detektion der TKI-induzierten Veränderungen des Gesamtproteoms von Jurkat-Zellen. Die TKI-Behandlung erfolgte für 72 h unter Verwendung von PHA-M und IL-2 stimulierten Jurkat-Zellen sowohl in Anwesenheit der IC_{50} -Konzentrationen (3 µM Sunitinib, 6 µM Sorafenib, 20 µM Axitinib) als auch in Anwesenheit der physiologischen Konzentrationen (0,1 µM Sunitinib, 15 µM Sorafenib, 0,2 µM Axitinib) der TKI. Die in den Zelllysaten enthaltenen Proteine wurden im Vergleich zu einer DMSO-behandelten Kontrolle mittels Differenz-Gelelektrophorese (DIGE)-Technologie aufgetrennt und die erhaltenen Proteinmuster mit der Delta2D-Software (Decodon) analysiert. Dabei wurden pro Gel ca. 1100 Protein-*Spots* analysiert. Differentielle Protein-*Spots* (Faktor 2, $p \leq 0,05$) wurden aus einem präparativen Gel ausgestanzt, tryptisch verdaut und massenspektrometrisch untersucht. Die Identifizierung der Proteine erfolgte mittels Datenbanksuche (Mascot). Bei der Verwendung physiologischer Konzentrationen konnten trotz der sehr sensitiven DIGE-Technologie (0,03 ng pro Spot) für Sunitinib und Axitinib keine Veränderung im Proteinexpressionsmuster detektiert werden. Bei der Verwendung von TKI-Konzentrationen, die den ermittelten IC_{50} -Werten entsprachen, wurden in Anwesenheit von Sorafenib 18 Proteine (vier hochreguliert), in Anwesenheit von Sunitinib 21 Proteine (zwei hochreguliert) und in Anwesenheit von Axitinib 24 Proteine (16 hochreguliert) identifiziert. Tabelle 5.8 zeigt die Auflistung der regulierten Proteine, die bereits auf mRNA-Ebene validierten Proteine sind mit einem Stern markiert. Weiterführende Analysen aller identifizierten Proteine mittels FAC-Analyse unter Verwendung der DAVID-Datenbank ergaben nur für Sorafenib und Sunitinib eine Anreicherung von verschiedenen identifizierten Proteinen in bestimmten Stoffwechselwegen. Sorafenib reguliert die Fructose-bisphosphat Aldolase C herunter (Glykolyse und Glyconeogenese) und die Alpha-Enolase herauf (Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen, (Bennett et al. 2015)). Letzteres steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Untersuchung der Aktivierungsmarker unter Sorafenib-Einfluss. Sorafenib beeinflusst außerdem das Zytoskelett von Immunzellen (Cofilin \uparrow , Ezrin \uparrow), was ebenfalls eng mit der Aktivität dieser verknüpft ist (Samstag, John, and Wabnitz 2013). Eine eindeutige Aussage ob der Einfluss positiv oder negativ

ist, ließe sich jedoch erst nach Bestimmung des Phosphorylierungsgrades der genannten Proteine treffen, was im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgte.

Sunitinib reguliert hingegen Proteine, die der Proteasom-Maschinerie zugeordnet werden (Proteasomuntereinheit Beta Typ 3 und 6 ↓, Proteasomaktivatorkomplex Untereinheit 3 ↓). Zusätzlich beeinflusst Sunitinib auch die Aminoacyl-tRNA Biosynthese (Glycin-tRNA-Ligase ↑, Tryptophan-tRNA-Ligase ↑). Allerdings konnte von den genannten Proteinen nur die Proteasomuntereinheit Beta Typ 3, der Proteasomaktivatorkomplex Untereinheit 3 sowie die Tryptophan-tRNA-Ligase auch auf mRNA-Ebene verifiziert werden.

Analysen im Hinblick auf den Einfluss der identifizierten TKI-regulierten Proteine auf immunologische Prozesse ergaben, dass nur ein Bruchteil der identifizierten Proteine Funktionen in diesem Bereich ausüben. Unter Sorafenib-Behandlung hatte nur ein reguliertes Protein, unter Sunitinib- und Axitinib-Behandlung jeweils drei regulierte Proteine einen Einfluss auf verschiedene immunologische Prozesse. Unter Sorafenib-Behandlung wurde das an der Mastzellaktivierung beteiligte Protein NDRG1 herunter reguliert. Unter Verwendung hoher Sunitinib-Konzentrationen wurde neben Platin-2 (Funktion innerhalb der T-Zellaktivierung), auch die mitochondriale Thioredoxin-abhängige Peroxyreduktase (Differenzierung myeloider Zellen) sowie die an der Erythrozyten-Reifung beteiligte Glukose-6-phosphat 1-Dehydrogenase herunter reguliert. Axitinib induziert in hohen Dosen die Synthese von Moesin (essentiell für die Migration von Leukozyten) sowie die Hochregulation von Peroxyreduktase-1 (Zytotoxizität von NK-Zellen). Das in die T-Zell-Co-Stimulation involvierte Protein *growth factor receptor-bound protein 2* liegt dagegen bei hohen Axitinib-Konzentrationen herunter reguliert vor.

Tabelle 5.8 TKI regulierte Proteine von Immunzellen

A Mittels 2D-Gelelektrophorese und nachfolgender MALDI-TOF-Analyse identifizierte Sorafenib-regulierte Proteine (6 µM Sorafenib, 72 h) PHA-M und IL-2 stimulierter Jurkat-Zellen.

Gen	Protein	Regulationsfaktor	Funktion
ALDOC	<i>Fructose-bisphosphate aldolase C</i>	0,5	Glykolyse
ANXA5	Annexin A5	0,4	Ca ²⁺ -Bindung, Hämostase
ARHGDI1	<i>Rho GDP-dissociation inhibitor 1</i>	0,5	Inhibierung der Rho-Signaltransduktion, Inhibierung der Rho•GDP-Dissoziation
ATP5H*	<i>ATP synthase subunit d, mitochondrial</i>	0,3	((H ₂ -)Ionen-)Transport
CACYBP	<i>Calcyclin-binding protein</i>	0,2	Ca ²⁺ -abhängige Ubiquitinierung, Proteinabbau
CFL1	Cofilin-1	2,0	Zellmorphologie; Organisation des Zytoskeletts
EEF1D	Elongationfaktor 1-delta	0,3	Proteinbiosynthese, Transkription
ENO1	Alpha-Enolase	2,0	Glykolyse, Regulation der Transkription
EZR	Ezrin	2,0	Zytoskelett / Zellform
KRT19	<i>Keratin, type I cytoskeletal 19</i>	2,0	Organisation der Myofibrillen
NDRG1	Protein NDRG1	0,5	Stressantwort, Tumor-Suppressor
PEBP1*	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 1</i>	0,3	Serin-Protease-Inhibitor, RAF1-Inhibitor
PHB	Prohibitin	0,3	Inhibierung der DNA-Synthese,

			Regulation der Proliferation
RPS12	<i>40S ribosomal protein S12</i>	0,1	Ribonukleoprotein, Proteinbiosynthese
STRAP	<i>Serine-threonine kinase receptor-associated protein</i>	0,3	RNA-Prozessierung, TGFβ-Signaltransduktion
TALDO1*	Transaldolase	0,3	Gleichgewicht der Metabolite im Pentosephosphatweg
TPT1	<i>Translationally-controlled tumor protein</i>	0,3	Ca ²⁺ -Bindung/-Homöostase, Stabilisierung der Mikrotubuli, negativer Regulator der Apoptose
VIM	Vimentin	0,5	Organisation der Intermediärfilamente

B Mittels 2D-Gelelektrophorese und nachfolgender MALDI-TOF-Analyse identifizierte Sunitinib-regulierte Proteine (3 µM Sorafenib, 72 h) PHA-M und IL-2 stimulierter Jurkat-Zellen.

APRT*	Adenin-Phosphoribosyltransferase	0,4	AMP-Synthese, Purin-Verwertung
ATP5H*	ATP-Synthase, Untereinheit d, mitochondrial	0,3	((H ₂ -)Ionen-)Transport
CAPZA2	<i>F-actin-capping protein subunit alpha-2</i>	0,5	Organisation des Aktin-Zytoskeletts
CNDP2*	zytosolische nicht-spezifische Dipeptidase	0,3	Carboxypeptidase, Proteolyse
DNAJC9	<i>DnaJ homolog subfamily C member 9</i>	0,3	Chaperon
EIF3H	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H</i>	0,3	Initiierung Proteinsynthese, Regulation der Translation
ERP29	ER-residentes Protein 29	3,0	Proteintransport / -Sekretion
ESD	S-Formyl-Glutathionhydrolase	0,5	Serinhydrolase, Detoxifikation von Formaldehyd
G6PD	Glucose-6-phosphat 1-Dehydrogenase	0,5	Glukosemetabolismus, Produktion von Pentosen zur Synthese von Nucleinsäuren
GARS	Glycin-tRNA-Ligase	2,2	Proteinbiosynthese, Kopplung von Glycin und tRNA
GLO1	Laktoyl-Glutathionlyase	0,5	Regulation NFκB-Aktivität
IDH3A	Isozitat-Dehydrogenase [NAD], Untereinheit alpha, mitochondrial	0,3	Tricarbonsäurezyklus
LCP1	Plastin-2	0,3	Proteintransport; Aktinbindung
PHGDH	D-3-Phosphoglyceratdehydrogenase	0,5	Aminosäure-/Serin-Biosynthese
PRDX3	Thioredoxin-abhängige Peroxidreduktase, mitochondrial	0,3	Regulation Redoxstatus, Regulation NFκB-Aktivität
PSMB3*	<i>Proteasome subunit beta type-3</i>	0,5	Bestandteil vom Proteasom
PSMB6	<i>Proteasome subunit beta type-6</i>	0,3	Bestandteil vom Proteasom
PSME3*	<i>Proteasome activator complex subunit 3</i>	0,3	Regulation von Apoptose und Zellzyklus
STMN1	Stathmin	0,5	negative Regulation der Polymerisation der Mikrotubuli
TUFM*	Elongationsfaktor Tu, mitochondrial	0,4	Proteinbiosynthese, Aminoacyl-t-RNA-

WARS*	Tryptophan-tRNA-Ligase	0,5	Bindung an die Ribosomen Proteinbiosynthese, Kopplung von Tryptophan und tRNA
-------	------------------------	-----	---

C Mittels 2D-Gelelektrophorese und nachfolgender MALDI-TOF-Analyse identifizierte Sunitinib-regulierte Proteine (10 µM Axitinib, 72 h) PHA-M und IL-2 stimulierter Jurkat-Zellen.

BTF3	Transkriptionsfaktor BTF3	0,3	Initiierung Transkription
CACYBP	Calcyclin-binding protein	0,5	Ca ²⁺ -abhängige Ubiquitinierung, Proteinabbau
CFL1	Cofilin-1	2,0	Zellmorphologie; Organisation des Zytoskeletts
CLIC1*	<i>Chloride intracellular channel protein 1</i>	0,5	Bildung von Chlorid-Ionenkanälen, Ionen-transport
DNAJC9	<i>DnaJ homolog subfamily C member 9</i>	0,2	Chaperon
EZR	Ezrin	2,0	Zytoskelett / Zellform Verbindung zwischen
GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>	0,3	Wachstumsfaktorrezeptor und ras- Signaltransduktion
IMMT	<i>Mitochondrial inner membrane protein</i>	2,1	mitochondriale Ca ²⁺ -Homöostase
MARS*	Methionyl-tRNA-Synthetase	2,0	Proteinbiosynthese, Kopplung von Methionin und tRNA
MBLAC2	<i>Metallo-beta-lactamase domain-containing protein 2</i>	0,5	Hydrolaseaktivität, Bindung von Metallionen
MSN	Moesin	2,0	Verbindung Zytoskelett- Plasmamembran;
NPM1	Nukleophosmin	2,0	Ribosomenbiogenese, Zentrosomen- Duplikation, Histone-Assemblierung, Proliferation, Regulation von p53 und ARF
PFDN2	<i>Prefoldin subunit 2</i>	0,5	Proteinfaltung
PGAM1*	Phosphoglyceratmutase 1	0,4	Glykolyse
PKM2	Pyruvatkinase-Isozym M1/M2	0,5	Glykolyse
PRDX1	Peroxiredoxin-1	2,0	Redoxregulation, Regulation der Zellproliferation durch Reduktion von GDPD5
PSAT1	Phosphoserin-Aminotransferase	0,3	Aminosäure-/Serin-Biosynthese
PSMA2	<i>Proteasome subunit alpha type-2</i>	0,5	Bestandteil vom Proteasom
STMN1	Stathmin	0,5	negative Regulation der Polymerisation der Mikrotubuli
SYNCRIP	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q</i>	2,3	mRNA Prozessierung
TUBA1B	<i>Tubulin alpha-1B chain</i>	3,1	GTP-Bindung, Bestandteil der

			Mikrotubuli
UQCRFS1	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial</i>	0,2	Bestandteil der Atmungskette, Elektronentransport
UROD	Uroporphyrinogen-Decarboxylase	0,3	Porphyrin-Biosynthese
VDAC1	<i>Voltage-dependent anion-selective channel protein 1</i>	0,2	Ionentransport, Apoptose

*... auf mRNA-Ebene regulierte Proteine

Klinisch relevant sind jedoch nur die Ergebnisse der Untersuchungen mit Sorafenib, da die zur Detektion von differentiell synthetisierten Proteinen in Anwesenheit von Sunitinib und Axitinib Konzentrationen erforderten, die weit oberhalb der in den Patienten detektierten physiologischen Plasmakonzentrationen lagen.

5.2.6 Zusammenfassung

Die Proliferation wird mit zunehmender TKI-Konzentration vollständig inhibiert. Unter Verwendung der physiologischen Konzentrationen konnte nur für Sorafenib eine Inhibierung der Proliferation von Immunzellen gemessen werden. Dasselbe trifft auch auf die Viabilität der untersuchten Immunzellen nach TKI-Behandlung zu, wobei auch bei nicht-physiologischen Konzentrationen von Sunitinib und Axitinib Restaktivitäten von 20 % zu beobachten waren. Auch bei der Bestimmung der Apoptose-Induktion zeigte sich, dass Axitinib keine und Sunitinib erst in hohen Dosen Apoptose induziert. Untersuchungen zur Aktivierung von Caspase 3 zeigten jedoch, dass auch für Axitinib unter Verwendung von hohen Dosen aktive Caspase 3 nachweisbar ist, also Apoptose zunächst induziert wird. Dafür sprechen auch die Ergebnisse zur Aktivierung der Caspasen 8 und 9. Die Messung des Membranpotentials zeigte jedoch keine Depolarisierung unter Axitinib-Behandlung. Nur für Sunitinib und Sorafenib konnte die Initialisierung der Apoptose über den intrinsischen Weg nachgewiesen werden. Erklärt werden konnten die widersprüchlichen Beobachtung unter Axitinib-Behandlung mit einem Anstieg des anti-apoptischen Proteins Mcl-1, was die Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials inhibiert und damit die Apoptose auf diesem Weg inhibiert. Jedoch wird von Mcl-1 ein Zellzyklus-Arrest in der G2/M-Phase verursacht, was verzögert ebenfalls zur Apoptose führt. Sorafenib reduziert sowohl den Anteil an zytotoxischen T-Zellen als auch an regulatorischen T-Zellen. Es hemmt die Differenzierung von T-Zellen und hemmt die IFN γ -Produktion. Auch Sunitinib verringert den Anteil an regulatorischen T-Zellen und hemmt, wie auch Sorafenib, deren Aktivierung. Allein Axitinib hat keinen Einfluss auf den Anteil der Subpopulationen, deren Differenzierung und Aktivierung. Nur für Sorafenib konnten unter Verwendung physiologischer Konzentrationen Differentielle Proteinmuster identifiziert werden. Es fanden sich auch hier Hinweise, dass Sorafenib Einfluss auf den Energiestoffwechsel und die Aktivierung von Immunzellen nimmt.

5.3 Untersuchungen zur Resistenzentwicklung gegenüber TKIs im NZK

Eine Vielzahl von NZK-Patienten besitzt eine angeborene Resistenz gegen die TKI-Behandlung bzw. entwickelt im Verlauf der Behandlung innerhalb von 6 bis 15 Monaten eine solche. Genetische Alterationen von Zielstrukturen der TKI, wie dem VEGF-2-Rezeptor, können ursächlich für Resistenzen sein (Brian I. Rini, Campbell, and Escudier 2009). Die Aktivierung alternativer Signalwege, die erhöhte Sezernierung von TKI-bindender Plasmaproteine oder die Verringerung der intrazellulären TKI-Konzentration durch einen Transport aus der Zelle, sind als mögliche Ursachen für klinisch auftretende Resistenzen im Gespräch (B I Rini and Atkins 2009). Zur Aufklärung der mechanistischen Ursachen die im Laufe der TKI-Behandlung zu einer Resistenzentwicklung führen, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, Zelllinien zu etablieren, die eine dauerhafte TKI-Behandlung tolerieren. Das Ziel war es, durch den Vergleich der Proteome von TKI-sensitiven versus adaptierten Zellen Zielstrukturen zu identifizieren, die maßgeblich an der Entwicklung von Resistenzen gegenüber den verschiedenen TKIs beteiligt sein könnten.

5.3.1 Etablierung TKI-resistenter Modellzelllinien

Zur Etablierung TKI-resistenter Modellzelllinien wurden verschiedene Strategien verfolgt. Tumorzelllinien unterschiedlicher Histologie wurden sowohl mit hohen Dosen an TKI behandelt und zwar mit Konzentrationen, die dem 2,5-, 5-, 10-, und 20 fachen des IC_{50} -Wertes entsprachen (von Bubnoff et al. 2005), als auch für über ein Jahr mit langsam steigenden Konzentrationen (Morgillo et al. 2011). Da mit diesen Methoden keine erfolgreiche Langzeitkultivierung erreicht werden konnte und die verschiedenen Zelllinien wiederholt vollständig abstarben, wurden die Zellen alternativ mit N-Ethyl-Nitrosoharnstoff (ENU) mutagenisiert und anschließend durch die TKI-Behandlung selektioniert. Die Mutagenisierung unter Verwendung von ENU führt zu einer Ethylierung von nukleophilen Gruppen der Nukleinsäuren. Diese Ethylierung führt bei der Replikation zu Fehlpaarungen im komplementären Strang, die zu Punktmutationen (AT→GC, AT→TA, GC→CG und GC→TA) führen (Bradeen et al. 2006). Die mutagenisierten Zellen wurden ebenfalls für ein Jahr mit langsam steigenden TKI-Konzentrationen (0,1-15 μ M) weiter behandelt. Abbildung 5.21 zeigt den experimentellen Ablauf schematisch. Trotz dieser Verfahrensweise konnten nur für den TKI Sunitinib Zellen generiert werden, die in der Lage waren, höhere Konzentrationen über längere Zeiträume zu tolerieren. Diese Zellen tolerierten Sunitinib-Konzentrationen von 15 μ M für einige Wochen. Da diese Zellen letztendlich dennoch abstarben, werden sie im Rahmen dieser Arbeit als Sunitinib-adaptierte Zellen bezeichnet. Die Generierung einer vollständig resistenten Zelllinie gelang nicht. Neben den chemoresistenten NZK-Zellen wurden auch chemosensitive Kolonkarzinomzelllinien (KK) mutagenisiert, welche im zeitlichen Verlauf die stabilste Anpassung an die Sunitinib-Behandlung zeigten.

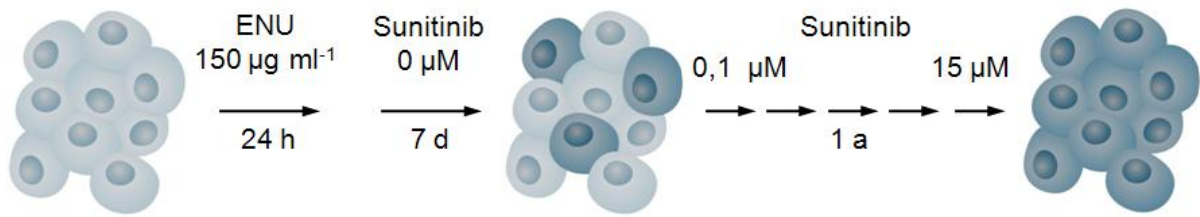


Abbildung 5.21 Schema zum experimentellen Ablauf der ENU-Mutagenisierung und Selektion

5.3.2 Viabilität der Sunitinib-adaptierten Zellen unter TKI-Behandlung

Mit Hilfe des XTT-Assay sollte zunächst überprüft werden, ob die Sunitinib-adaptierten Zellen höhere IC₅₀-Werte aufwiesen. In Abbildung 5.22 ist die Dosis-abhängige Sunitinib-induzierte Abnahme der Zellviabilität für die KK-Zelllinie HCT116 gezeigt.

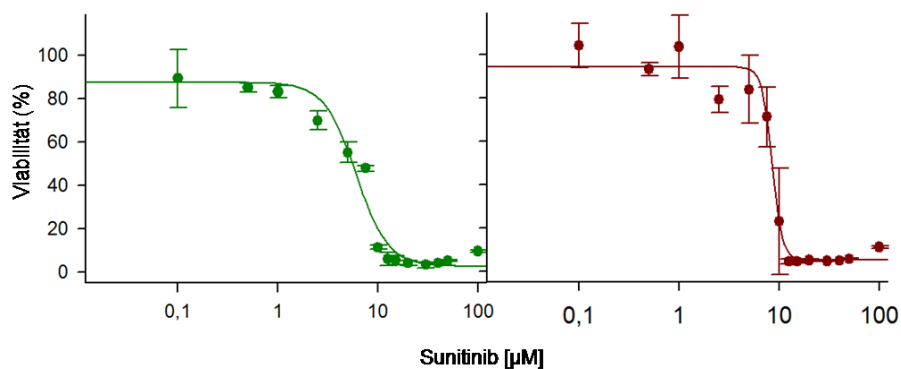


Abbildung 5.22 Zytotoxische Aktivität von Sunitinib auf wildtypische (grün) und Sunitinib-adaptierte (rot) HCT116-Zellen.

Die Zellen wurden 48 h mit unterschiedlichen Sunitinib-Konzentrationen (0-100 µM) behandelt und anschließend 4 h mit dem XTT-Reagenz inkubiert. Die Daten geben den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen biologischen Replikaten an.

Tabelle 5.9 zeigt die IC₅₀-Werte der Sunitinib-adaptierten Zelllinien im Vergleich mit den jeweiligen nicht mutagenisierten Wildtyp (WT)- Zellen. Dabei zeigte sich, dass durch die ENU-Mutagenisierung und anschließende Selektionierung mit steigenden Sunitinib-Konzentrationen die IC₅₀-Werte maximal verdreifacht werden konnten. Ausschlaggebend für die Anpassung an Sunitinib ist jedoch die Stabilität der Zellen unter Langzeitbehandlung. So sind die Wildtypzellen (WT) maximal 72 h in Anwesenheit von 15 µM Sunitinib kultivierbar, wohingegen die adaptierten Zellen diese Sunitinib-Konzentration wochenlang aushielten und auf Sunitinib-Entzug sogar empfindlich reagierten.

Tabelle 5.9 IC₅₀-Werte wildtypischer und Sunitinib-adaptierter Zelllinien

Zelllinie	IC ₅₀ -Wert Wildtyp [µM]	IC ₅₀ -Wert Sunitinib-adaptiert [µM]
HCT116	6,0 ± 0,7	8,4 ± 0,4
Cako2	4,9 ± 0,6	6,8 ± 0,5
RKO	4,5 ± 0,6	6,5 ± 0,5
SW480	6,4 ± 0,4	10,3 ± 0,3
HT29	3,5 ± 0,4	10,9 ± 0,8
MZ2905RC	3,0 ± 0,5	7,9 ± 0,8

5.3.3 Analyse der Apoptoserate der Sunitinib- adaptierten Zellen

Mittels APC-Annexin V/7AAD- Färbung sollten die Unterschiede der Apoptoserate von Sunitinib-sensitiven Wildtypzellen und Sunitinib-adaptierten Zellen in Anwesenheit von Sunitinib verglichen werden. Dafür wurden Wildtypzellen 48 h in Ab- und Anwesenheit von 5-10 µM Sunitinib kultiviert. Die adaptierten Zellen stammten aus Langzeitkultivierungen in Anwesenheit von 15 µM Sunitinib. Die Analyse der Apoptoserate erfolgte nach Färbung der Zellen mit APC-konjugiertem Annexin V und 7AAD durchflusszytometrisch. Abbildung 5.23 zeigt an der KK-Zelllinie HCT116, dass die Sunitinib-adaptierten Zellen auch in Anwesenheit von 15 µM Sunitinib kaum früh-apoptotisch (Annexin V⁺/7AAD⁻) sind, wohingegen die sensitiven Wildtypzellen fast vollständig früh- oder sogar spät-apoptotische Merkmale aufweisen.

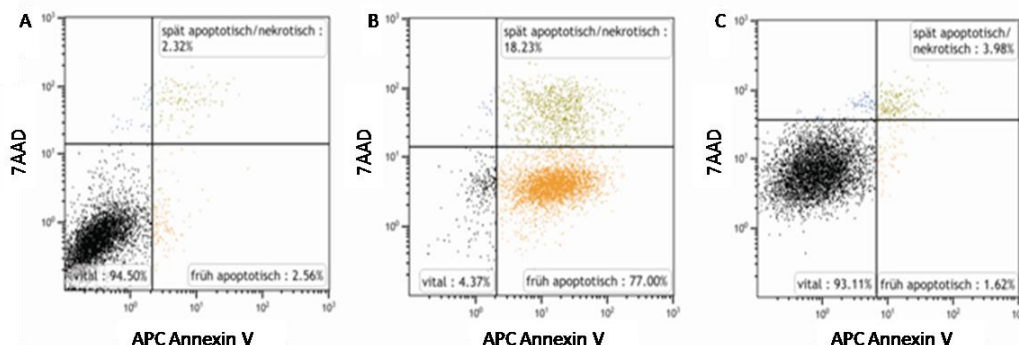


Abbildung 5.23 Veränderte Apoptoserate in Sunitinib-sensitiven vs. Sunitinib-adaptierter HCT116 Zellen

Sunitinib-sensitive und Sunitinib-adaptierte Zellen wurden nach 48 h Inkubation in Ab- bzw. Anwesenheit von Sunitinib mittels APC-Annexin V/7AAD-Färbung markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Schwarz: Vitale Zellen, orange: früh-apoptotische Zellen, grün: spätapoptotische Zellen; A: DMSO-Kontrolle WT Zellen, B: WT Zellen mit 10 µM Sunitinib, C: Sunitinib-adaptierte Zellen aus Langzeitkultivierung mit 15 µM Sunitinib.

Abbildung 5.24 fasst die prozentualen Anteile von früh-apoptotischen Zellen (Annexin V⁺/7AAD) unterschiedlicher Zelllinien in Abhängigkeit der Sunitinib-Konzentration zusammen. Bei den sensitiven Wildtypzellen steigt der Anteil an früh-apoptotischen Zellen im Vergleich zu den DMSO-behandelten Kontrollen bereits ab einer Sunitinib-Konzentration von 5 µM stark an, wohingegen für die adaptierten Zellen in Anwesenheit von 15 µM Sunitinib im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle keine Erhöhung des Anteils an früh-apoptotischen Zellen detektierbar war. Für die KK-Zelllinie HT29 wurde eine Abnahme des prozentualen Anteils von

früh-apoptotischen Zellen in Anwesenheit von 10 μM Sunitinib detektiert. Diese Zellen waren jedoch keinesfalls vitaler, sondern befanden sich zu diesem Zeitpunkt bereits in der spät-apoptotischen Phase oder waren nekrotisch.

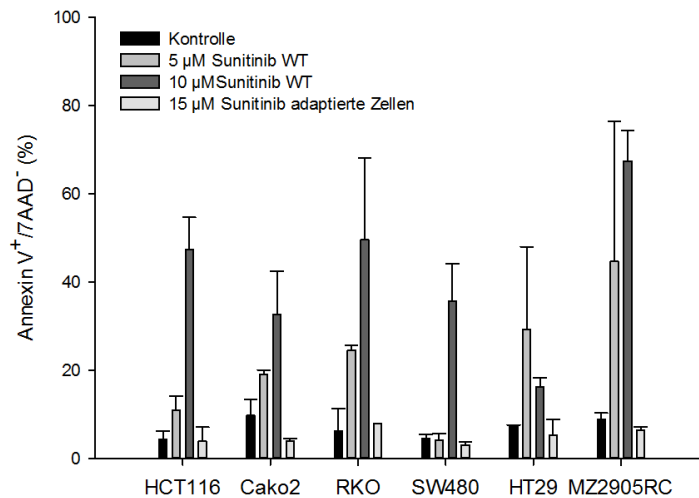


Abbildung 5.24 Veränderte Apoptoserate in Sunitinib-sensitiven vs. Sunitinib-adaptierten Zellen

Sunitinib-sensitive und Sunitinib-adaptierte Zellen wurden nach 48 h Inkubation in Ab- bzw. Anwesenheit von 5-10 mM (WT Zellen) Sunitinib mittels APC-Annexin V/7AAD-Färbung markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 biologischen Replikaten dargestellt.

Zur Verifizierung dieser Daten wurde zusätzlich die Aktivierung der Caspase 3 durchflusszytometrisch gemessen. Der prozentuale Anteil von Zellen mit nachweisbar aktivierter Caspase 3 ist in allen getesteten Sunitinib-adaptierten Zelllinien vergleichbar mit den entsprechenden Wildtypzellen nach DMSO- Behandlung (Kontrolle). Im Gegensatz dazu zeigten die sensitiven WT-Zellen in Anwesenheit von 10 μM Sunitinib erwartungsgemäß einen starken Anstieg von Zellen mit aktivierter Caspase 3 (Abbildung 5.25).

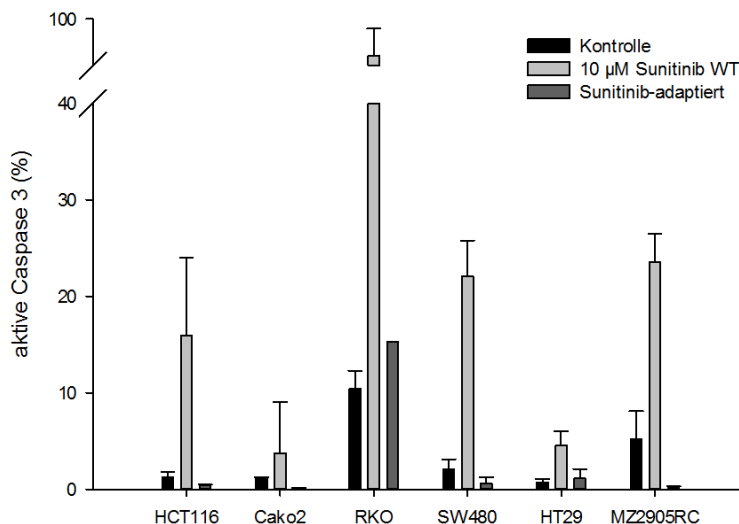


Abbildung 5.25 Veränderte Caspase 3-Aktivität in Sunitinib-sensitiven vs. Sunitinib-adaptierter Zellen

Sunitinib-sensitive WT Zellen und Sunitinib-adaptierte Zellen wurden nach 48 h Inkubation in Ab- bzw. Anwesenheit von Sunitinib mit FITC-konjugierten anti-*cleaved* Caspase 3-Antikörper markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 biologischen Replikaten dargestellt.

5.3.4 Vergleich der differentiellen Proteommuster sensibler und adaptierter Zellen zur Aufklärung der Resistenzentwicklung

Um Anhaltspunkte für mögliche molekulare Ursachen einer Resistenzentwicklung zu gewinnen, wurden Sunitinib-sensitive WT-Zellen und Sunitinib-adaptierte Zellen in ihren Proteinexpressionsmustern verglichen. Dafür wurden sowohl unbehandelte (DMSO-Kontrolle) als auch Sunitinib-behandelte (5 μ M) WT-Zellen mit den Sunitinib-adaptierten Zellen unter Dauerbehandlung (15 μ M) mittels 2D-DIGE analysiert. Als Modellzelllinie wurde die KK-Zelllinie HCT116 gewählt, da sie zum Zeitpunkt der Untersuchung unter Sunitinib-Dauerbehandlung die höchste Teilungsrates aufwies. Abbildung 5.26 zeigt die schematische Versuchsanordnung.

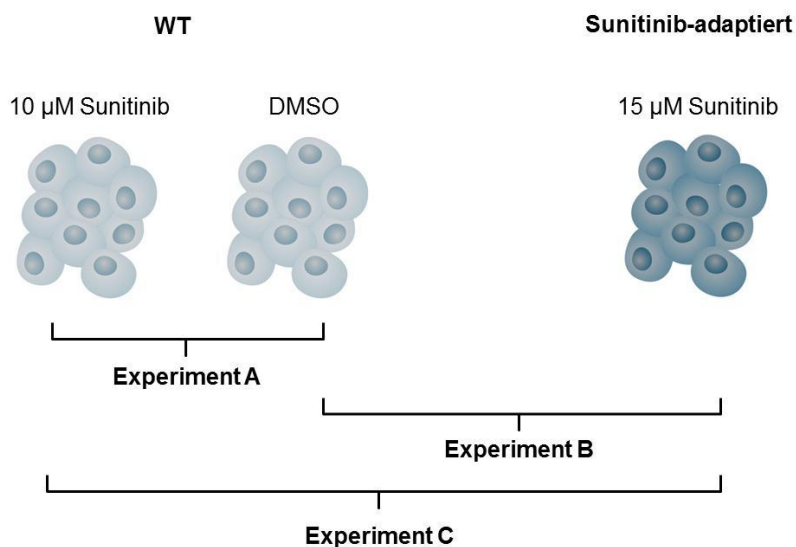


Abbildung 5.26 Schematische Versuchsanordnung der Proteom-basierten Untersuchungen

Die Identifizierung möglicher an der Resistenzentwicklung gegenüber Sunitinib beteiligten Proteine erforderte drei Teilexperimente (A, B, C). Experiment A, der Vergleich der Proteinexpressionsmuster der WT-Zellen in Ab- und Anwesenheit von Sunitinib, selektierte Proteine, die auf Grund der Sunitinib-Behandlung in den WT-Zellen differentiell synthetisiert wurden. Experiment B, der Vergleich des Proteinexpressionsmusters der WT-Zellen in Abwesenheit von Sunitinib mit dem der Sunitinib-adaptierten Zellen in Anwesenheit von Sunitinib, erfasste sowohl die Sunitinib-induzierten proteomischen Veränderungen als auch die Proteine, die durch die Anpassung an Sunitinib differentiell exprimiert vorlagen. Experiment C, der Vergleich des Proteinexpressionsmusters der WT-Zellen in Anwesenheit von Sunitinib mit dem der Sunitinib-adaptierten Zellen in Anwesenheit von Sunitinib, diente der Identifizierung möglicher proteomischer Veränderungen, die auf Grund der Gewöhnung an Sunitinib auftraten. Proteine, die in den Teilexperimenten A und B um den gleichen Faktor reguliert sind, können ausschließlich auf die Anwesenheit von Sunitinib zurückgeführt werden und sind höchstwahrscheinlich nicht an der Resistenz-Entwicklung beteiligt.

Im Folgenden sind alle identifizierten Proteine der jeweiligen Versuchsanordnungen tabellarisch aufgeführt (Tabelle 5.10). Die WT-Zellen wurden 72 h entweder mit 5 μ M Sunitinib oder mit der entsprechenden Menge an DMSO behandelt. Die Sunitinib-adaptierten Zellen stammten aus der Dauerkultivierung in Anwesenheit von 15 μ M Sunitinib. Durchschnittlich wurden pro Gel ca. 1100 Spots detektiert und analysiert. Die differentiell regulierten Proteine (Regulationsfaktor 2, $p \leq 0,05$) wurden weiterführend massenspektrometrisch untersucht.

Tabelle 5.10

A: HCT116 WT-Zellen in An- und Abwesenheit von 5 μ M Sunitinib

Gen	Protein	Regulationsfaktor	Funktion
ANXA3	Annexin A3	2,9	Phospholipase A2 –Inhibitor, Angiogeneseregulation, Regulierung der Phagozytose, endotheliale Migrationsregulation
GSS	Glutathionsynthetase	2,3	Redoxhomöostase
LMNA	Prelamin-A/C	2,0	Zellkernzusammensetzung, Chromatinorganisation und Telomerdynamik
TBCA	<i>tubulin-specific chaperone A</i>	0,3	Beta-Tubulin-Faltung
PRDX1	Peroxiredoxin-1	0,3	Zellproliferation durch Reduktion von GDPD5
CCT2	<i>t-complex protein 1 subunit beta</i>	0,4	Aktin- und Tubulin-Faltung, Motilität
LGALS1	Galectin-1	0,4	Regulation von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion, Apoptose, Differenzierung und Proliferation
PEBP1	Phosphatidylethanolamin-bindende Protein 1	0,5	Serin-Protease-Inhibitor, RAF1-Inhibitor

B: HCT116 WT-Zellen DMSO-Kontrolle vs. Sunitinib-adaptierte Zellen

ALDH1A3	Aldehyddehydrogenase Familie 1 Mitglied A3	2,7	Pro-apoptotisch, Embryonalentwicklung z. B. Auge
HSPB1	Hitzeschockprotein β -1	2,2	zelluläre Antwort auf VEGF-Bindung, Stressresistenz (UPR)
ANXA3	Annexin A3	2,1	Phospholipase A2 –Inhibitor, Angiogeneseregulation, Regulierung der Phagozytose, endotheliale Migrationsregulation
VDAC3	<i>voltage-dependent anion-selective channel protein3</i>	0,3	mitochondrialer Ionen-Kanal
LGALS1	Galectin-1	0,4	Regulation von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion, Apoptose, Differenzierung und Proliferation
PEBP1	Phosphatidylethanolamin-bindende Protein 1	0,4	Serin-Protease-Inhibitor, RAF1-Inhibitor
KRT8	Keratin, <i>type II cytoskeletal 8</i>	0,5	Extrinsischer Apoptose-Signalweg

C: HCT116 WT-Zellen in Anwesenheit von 5 µM Sunitinib vs. Sunitinib-adaptierte Zellen

IMPDH2	Inosin-5´monophosphat- Dehydrogenase	3,4	Purin-Metabolismus, Regulation des Zellwachstums
TXNRD1	Thioredoxinreduktase 1	2,8	Aktin- und Tubulin-Polymerisation, extrinsischer Apoptose-Signalweg
NDUFS3	NADH-Dehydrogenase-[Ubichinon]-Eisen-Schwefelprotein 3	0,3	negative Regulation von Zellwachstum und intrinsischem Apoptose-Signalweg, metabolische Prozessierung niedermolekularer Moleküle
PAFAH1B3	<i>platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma</i>	0,3	Gehirnentwicklung, Lipid-Metabolismus
CFL1	Cofilin-1	0,4	Aktin-Organisation, inerte Immunantwort
ERP29	<i>endoplasmic reticulum resident protein 29</i>	0,4	MAPK-Aktivierung, Proteinfaltung- und Transport/-Sekretion

Annexin A3 (ANXA3), Galektin-1 (LGALS1) und Phosphatidylethanolamin-Bindeprotein 1 (PEBP1) treten in Versuch A und B gleichermaßen auf. Annexin A3 wird in beiden Versuchen hochreguliert und spiegelt die anti-angiogenetische Wirkung von Sunitinib wieder. Galektin-1 und Phosphatidylethanolamin-bindeprotein 1 liegen beide unter Sunitinib-Behandlung herunter reguliert vor und regulieren die Zell-Zell-Interaktion bzw. die Signaltransduktion innerhalb der Zelle. Galektin-1 ist außerdem an der Apoptose-Regulation und Proliferation beteiligt. Keins der Proteine aus Versuch A und B konnte in Versuch C differenziell synthetisiert nachgewiesen werden. Neben Proteinen, die vor allem das Zellwachstum regulieren (NADH-Dehydrogenase-[Ubichinon]-Eisen-Schwefelprotein 3↓, Inosin-5´monophosphat-Dehydrogenase↑), treten vor allem Proteine, die die Apoptose regulieren in den Vordergrund (Thioredoxinreduktase 1↑, NADH-Dehydrogenase-[Ubichinon]-Eisen-Schwefelprotein 3↓). Das endoplasmatische Retikulum Protein ERp29 ist an der Protein-Stressantwort beteiligt, sowie der intrazellulären Signaltransduktion über den MAP-Kinase Signalweg. Es liegt in Sunitinib-adaptierten Zellen im Vergleich zu sensitiven WT-Zellen herunter reguliert vor und gibt einen Hinweis auf eine verminderte Stress-Antwort der adaptierten Zellen unter Sunitinib-Behandlung. Fünf Proteine konnten anschließend auf mRNA-Ebene in ihrer Regulation in HCT116 validiert werden: LGALS1, CCT2, ALDH1A3, ERp29 und TXNRD1 (Abbildung 5.27). Eine Regulation von LGALS1 wurde auch für RKO-Zellen nachgewiesen. Eine Regulation von CCT2 wurde sowohl in den KK-Zelllinien RKO und HT29 als auch in der NZK-Zelllinie MZ2905RC nachgewiesen. Die ALDH1A3 wird in Caco2 um den Faktor 12000 hoch reguliert, in RKO um den Faktor 2000. Aber auch SW480 und HT29 weisen eine Hochregulation dieses Proteins auf. ERp29 wurde auf mRNA-Ebene in WT-Zellen unter Sunitinib-Behandlung der Zelllinie Caco2 hoch reguliert nachgewiesen und in adaptierten Zellen herunter reguliert. Für die Untersuchung der mRNA-Regulation wurden WT-Zellen für 72 h mit DMSO (Kontrolle) oder 10 µM Sunitinib behandelt. Die Sunitinib-adaptierten Zellen stammten aus Langzeitkultivierung mit 15 µM Sunitinib.

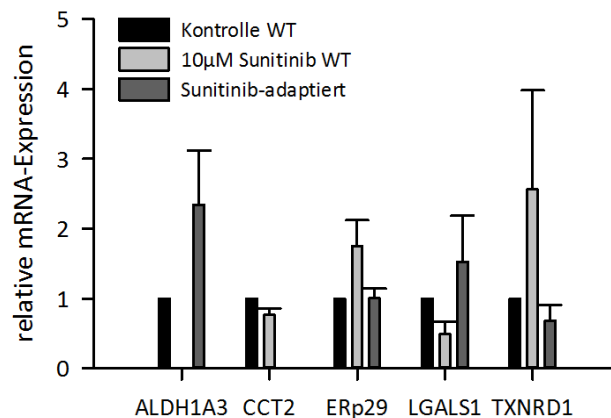


Abbildung 5.27 mRNA Regulation der proteomisch identifizierten, regulierten Proteine in HCT116

Sunitinib-behandelte WT-Zellen (10 µM Sunitinib) und Sunitinib-adaptierte Zellen (15 µM Sunitinib) wurden mit DMSO-behandelten WT-Zellen verglichen. Die Daten geben den Mittelwert ± Standardabweichung von drei unabhängigen biologischen Replikaten an.

ERp29 wird aktuell sowohl als Tumorsuppressor (Gondi et al. 2007) als auch als Tumor-Enhancer (Mkrтчian et al. 2008) diskutiert. Daher sollte dessen Expression unter Sunitinib-Behandlung auf Protein-Ebene auch für das NZK untersucht werden. Dafür wurde die NZK-Zelllinie MZ2905RC ausgewählt. Von dieser Zelllinie konnte eine Sunitinib-adaptierte Variante etabliert werden, welche jedoch in ihrem Wachstum sehr instabil war. Die Zelllinie wurde hinsichtlich der ERp29-Expression unter Sunitinib-Behandlung in ihrer sensitiven WT- (5 µM Sunitinib) und adaptierten Form (15 µM Sunitinib Langzeitkultur) untersucht. Abbildung 5.28 zeigt einen *Western Blot* der Zelllinie MZ2905RC mit ERp29-spezifischen Antikörpern. Wenn auch nicht signifikant zeigte sich in 3 unabhängigen Versuchen eine Hochregulation von ERp29 unter Sunitinib-Behandlung in WT-Zellen und ein Rückgang der Expression auf ein unbehandeltes WT-Niveau in adaptierten Zellen. Dies lässt auf eine verminderte Stressantwort innerhalb der adaptierten Zellen schließen. ERp29 kann demnach als Resistenzmarker in Betracht gezogen werden.

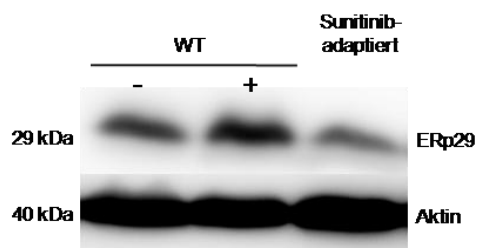


Abbildung 5.28 ERp29-Expression unter Sunitinib-Behandlung in sensitiven und adaptierten MZ2905RC Zellen

Sunitinib-sensitive WT-Zellen wurden 72 h in Anwesenheit von DMSO bzw. 10 µM Sunitinib kultiviert. Die Sunitinib-adaptierte Zellen stammten aus Langzeitkultivierung mit 15 µM Sunitinib. Die Zellen wurden aufgeschlossen, je 50 µg Gesamtprotein/Bande mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membran überführt und mit anti-ERp29 (Thermo Scientific) detektiert.

5.3.5 Zusammenfassung

Es konnten keine vollständig Sunitinib-resistenten Zellen etabliert werden. Es gelang jedoch mit Hilfe der ENU-Mutagenese Sunitinib-adaptierte Kolonkarzinom-Zellen zu generieren, die einige Wochen bei einer bis zu 3-fachen IC_{50} -Konzentration kultiviert werden konnten. Für diese Zellen konnte eine ausbleibende Apoptose-Induktion nachgewiesen werden. Untersuchungen des Proteoms der WT-Zellen im Vergleich mit den adaptierten Zellen identifizierten drei Proteine, die durch Sunitinib-Behandlung sowohl in WT-Zellen als auch in adaptierten Zellen reguliert vorlagen, Annexin A3, Galektin-1 und Phosphatidylethanolamin-Bindeprotein 1. Diese werden mit der anti-angiogenetischen Wirkung von Sunitinib in Verbindung gebracht, sowie mit der Zell-Zell-Interaktion. Die Proteine, die Resistenz-abhängig reguliert zu sein scheinen (Tabelle 5.10 C), konnten der Apoptose-Regulation und der Stressantwort zugeordnet werden. Das Protein ERp29 sollte als potentieller Resistenzmarker weiter untersucht werden.

6 Diskussion

6.1 Identifizierung von Biomarkern zur Überwachung der Behandlung

6.1.1 Potentielle intrazelluläre Biomarker

Tumore entstehen durch den Verlust von Tumorsuppressorgenen. Das an der Entstehung des klarzelligen NZK beteiligte VHL-Gen ist ein solches Tumorsuppressorgen (Latif et al. 1993). Diese Gene regulieren die DNA-Reparatur, die Expression von Wachstumshormonen, den Zellzyklus, die Apoptose sowie die Verankerung im Gewebe. Ihr Verlust führt dazu, dass Zellen mit Defekten im Erbgut sich teilen anstatt in einen Zellzyklusarrest zu gehen bis der Defekt behoben ist, oder falls eine Reparatur nicht möglich ist, die Apoptose einzuleiten (Sherr 2004). Tumore sind daher nicht homogen in ihrem genetischen Hintergrund (Park et al. 2010). Biomarker für die Überwachung der Behandlung zu finden, die für alle Patienten gleichermaßen zutreffend sind, ist dadurch nicht einfach. Ansätze, die Heterogenität von Tumoren selbst als Biomarker zu definieren, belegen, wie wichtig dieser Aspekt ist (Merlo und Maley 2010). Die Heterogenität der Tumore sollte vor allem bei der Suche nach der richtigen Behandlungsmethode im Rahmen der personalisierten Medizin beachtet werden. Die verschiedenen TKI wurden entwickelt, um Tumorzellen zu adressieren, die durch eine Überproduktion von Wachstumsfaktoren wie VEGF und der damit verbundenen Daueraktivierung der korrespondierenden RTKs charakterisiert sind (Liu et al. 2006). Die Reaktion der einzelnen Zellen des Tumors auf die Blockierung dieser Kinasen, kann auf Grund ihrer genetischen Heterogenität nicht homogen sein. Die Versuche zur Viabilität verschiedener NZK-Zelllinien in dieser Arbeit haben gezeigt, dass eine Behandlung der Zellen Dosis-abhängig zum Zelltod führt. Aber bereits die Untersuchung der Aktivierung der *downstream* gelegenen *extracellular-signal regulated kinase* (ERK) gestaltete sich schwierig. Die Ergebnisse waren extrem heterogen, sowohl zwischen den verwendeten Zelllinien als auch für die einzelnen TKI, sodass keine generelle Inhibierung der Aktivierung dieser Kinase nachweisbar war.

Auch die Untersuchung der Caspase 3-Aktivierung führte zu heterogenen Ergebnissen. In Anwesenheit von Sunitinib und Axitinib war eine Aktivierung der Caspase 3 bei zwei von drei verwendeten NZK-Zelllinien nachweisbar. Die Versuchsbedingungen waren für alle Zelllinien gleich definiert, die Behandlung erfolgte mit 5 μM TKI für 72 h. Für Sorafenib zeigte sich, dass ein Großteil der MZ1795RC und MZ2905RC Zellen sich bereits abgelöst hatte und im Mikroskop deutlich nekrotisch erschienen, wohingegen die MZ1257RC Zellen noch keine Zeichen für eine negative Beeinflussung zeigten. Der IC_{50} -Wert für Sorafenib ist für alle drei Zelllinien deutlich höher definiert worden, was zwar die noch nicht nachzuweisende Wirkung auf die MZ1257RC ($\text{IC}_{50}=22 \mu\text{M}$) erklärt, nicht aber den fortgeschrittenen Apoptosestatus von MZ1795RC ($\text{IC}_{50}=26 \mu\text{M}$) und MZ2905RC ($\text{IC}_{50}=18 \mu\text{M}$). Eine einheitliche Dosierung zu finden, die es erlaubte, die Zellen lange genug für die Untersuchung von proteomischen Veränderungen kultivieren zu können, dabei aber hoch genug für die Initialisierung zellulärer Veränderungen war, gestaltete sich über den gesamten Untersuchungszeitraum sehr schwierig. Die Tumorzellen reagierten zudem sehr unterschiedlich auf verschiedene Chargen der TKI. Auch das Alter der einzelnen Zellen nahm Einfluss auf die Behandlungseffizienz. Es wurde daher mit möglichst niedrigen Passagen der Zellen gearbeitet und die TKI wurden nach dem Lösen in DMSO aliquotiert, bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ tiefgefroren und nach dem Auftauen zeitnah verbraucht. Aber auch diese Maßnahmen verhinderten nicht, dass die Zellen sehr heterogen auf die Behandlungen ansprachen. Die Zellen starben allerdings immer nach der Behandlung mit TKI, auch wenn die

Inhibierung der Zielstrukturen nicht direkt nachweisbar war. Daher schloss sich die Untersuchung verschiedener Apoptosemarker an, um mögliche Biomarker zu finden. Auch hier war eine starke Heterogenität in den einzelnen Proteinregulationsmustern zwischen den Zelllinien zu beobachten. Nur zwei Proteine waren in allen drei Zelllinien stabil herunter reguliert, Mcl-1 und Survivin. Beide Proteine wurden bereits für andere Krebsarten als verstärkt synthetisiert beschrieben (Belmar und Fesik 2015; Fukuda und Pelus 2006) und werden als Biomarker für Diagnostik und Prognostik eingesetzt. Parker et al. beschrieben schon 2009, dass erhöhte Expressionsraten von Survivin im NZK mit einer schlechten Prognose für den Patienten korrelieren (Keuling et al. 2009). Die Studien von Parker bezogen sich auf 312 NZK-Zelllinien. Zumindest für drei NZK-Zelllinien konnte im Rahmen dieser Arbeit eine signifikante Herunterregulation unter TKI-Behandlung nachgewiesen werden. Dies ist ein Hinweis, dass die verwendeten TKI im Stande sind, die durch Survivin vermittelte zellzyklusabhängige Apoptose-Inhibierung rückgängig zu machen. Auch Mcl-1 wirkt anti-apoptotisch und ist in diversen Krebsarten, darunter Lungenkrebs (Song et al. 2005) und Brustkrebs (Ding et al. 2007) als verstärkt exprimiert beschrieben. Dass alle drei verwendeten TKI dieses Protein herunter regulierten, zeigt deutlich, dass die TKI im Stande sind, die Apoptose-Inhibierung der Tumorzellen aufzuheben.

Um die Apoptose-Mechanismen unter TKI-Behandlung genauer zu verstehen, wurde die Synthese verschiedener Proteine der Bcl-2 Familie näher untersucht. Dabei wurde deutlich, dass auch hier eine starke Heterogenität zwischen den untersuchten Zelllinien vorherrscht. Das bereits besprochene Familienmitglied Mcl-1 war als einziges Protein homogen herunter reguliert. Indem es sowohl an die pro-apoptotischen Effektorproteine (Bax und Bak) als auch an die pro-apoptotischen BH3-*only* Proteine (Bid, Puma und Noxa) bindet, inhibiert Mcl-1 den intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweg. Williams et al. diskutieren, ob eine direkte Adressierung von Mcl-1 in Mcl-1-überexprimierenden resistenten Brustkrebszellen, die Ansprechraten auf Chemotherapie, Bestrahlung und zielgerichtete Therapien positiv beeinflussen könnte (Williams and Cook 2015). Damit ist Mcl-1 nicht nur ein möglicher Biomarker für den Wirknachweis der TKI, sondern selbst eine Zielstruktur für zielgerichtete Therapien (Belmar und Fesik 2015). Auch das anti-apoptotisch wirkende Bcl-2 Protein wird in resistenten Brustkrebszellen verstärkt exprimiert (Crawford und Nahta 2011). In den hier untersuchten Zelllinien wird es unter TKI-Behandlung sehr heterogen exprimiert. Unter Axitinib- und Sorafenib-Behandlung zeigten alle drei Zelllinien eine stabile Herunterregulation. Dieses Protein reguliert den intrinsischen Apoptoseweg, indem es die Integrität des Membranpotentials der Mitochondrien durch Bindung an Bax aufrecht erhält, da es die Cytochrom *c*- Freisetzung inhibiert (Siddiqui, Ahad, und Ahsan 2015). Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie werden auch Zellzyklus-abhängig reguliert. Bcl-xL und Bcl-2 werden bei einem Zellzyklusarrest in der Mitose phosphoryliert und verlieren ihre anti-apoptotische Wirkung. Diese Regulation ermöglicht sowohl einen Aufschub des intrinsischen Apoptosewegs für DNA-Reparaturen als auch eine Initialisierung der Apoptose, sollte die Zelle zu lange an dem entsprechenden *Checkpoint* verweilen (Terrano, Upreti, und Chambers 2010). Dieser Mechanismus wird bei Überproduktion der anti-apoptotischen Familienmitglieder jedoch inhibiert, sodass diese mit der Resistenz gegenüber DNA-schädigenden Therapien in Verbindung gebracht werden kann (Colin et al. 2015).

BAG1 agiert als Bindeglied zwischen den membranständigen TKI-Zielstrukturen (z.B. VEGFR) und Bcl-2. Es wirkt verstärkend auf die anti-apoptotische Funktion von Bcl-2 und schützt Bcl-2 und Mcl-1 vor Degradation (Aveic, Pigazzi, und Basso 2011). Überproduktion dieses Proteins schützt damit die Zelle vor diversen Apoptose-induzierenden Einflüssen, wie Bestrahlung oder Chemotherapie, und wird für viele Tumorarten hochreguliert beschrieben (Liu et al. 2014). Es ist unabhängig von Bcl-2 durch die Bindung an vielfältige Interaktionspartner, wie Raf1 und HSP70, an diversen zellulären Prozessen beteiligt. Dazu gehören Stressantwort, Proliferation, Migration und Proteinfaltung/-degradation (Murphy 2013). Sunitinib und Sorafenib regulierten BAG1 in allen untersuchten Zelllinien herunter, Axitinib gelang dies nur in zwei von drei Fällen. Dies macht BAG1 zum Kandidatenbiomarker für die Behandlungseffizienz für Sunitinib und Sorafenib.

Bcl-2 spielt auch eine Rolle bei der Regulation der Autophagie von Krebszellen. Es inhibiert die Autophagie durch Bindung an Beclin-1 (Pattingre et al. 2005). Dies erklärt jedoch nicht die Herunterregulation von Beclin-1 nach der TKI-Behandlung, die in dieser Arbeit für Sorafenib und teilweise auch für Sunitinib und Axitinib nachgewiesen wurde. Autophagie schützt den Organismus vor der Entstehung von Tumoren (Levine und Kroemer 2008). Ist z.B. Beclin-1 durch eine Mutation inaktiv, treten spontane Tumorbildungen auf. Hat sich ein Tumor jedoch etabliert, nutzt er die Autophagiemaschinerie, um sich vor dem Einfluss von Chemotherapien zu schützen oder sogar sein Wachstum anzuregen (Crocì et al. 2012). Die in dieser Arbeit verwendeten Tumorzelllinien wurden aus bereits etablierten soliden Tumoren entnommen und kultiviert. Daher liegt es nahe, dass Beclin-1 eine Rolle bei der Tumorgenese inne hat. Die TKI-Behandlung sorgt hierbei für eine Herunterregulation von Beclin-1 und so für eine Inhibierung der Autophagie. Wei et al. konnten zudem einen direkten Zusammenhang zwischen der TKI-Zielstruktur EGFR und Beclin-1 dokumentieren (Wei et al. 2013). Die in Tumoren zu findende übermäßige EGFR-Aktivierung führt durch eine direkte Bindung von Beclin-1 zur Inhibierung der Autophagie. Die Inhibierung des Rezeptors durch die TKI-Bindung könnte zur Freisetzung von Beclin-1 führen und die Autophagiemaschinerie wieder aktivieren. Es sollte untersucht werden, ob dies für die Behandlung von Vorteil ist oder eine Resistenzentwicklung begünstigt, wie es Amaravadi et al. 2011 postulierten (Amaravadi et al. 2011). Für Lungenkarzinome (NSCLC) wird bereits eine Kombination von TKIs und Autophagie-Inhibitoren getestet (Wei et al. 2013). In der Zelllinie MZ1795RC erhöhte sich die Beclin-1-Konzentration nach Behandlung mit Sunitinib, was für eine verstärkte Autophagieaktivität spricht. Die Rolle der Autophagie und von Beclin-1 im NZK, sollte weiterführend genau untersucht werden, da sie sowohl positive als auch negative Auswirkungen für die Behandlung und damit für den Patienten haben kann.

Ein als Inhibitor der Autophagie diskutiertes Protein ist das in dieser Arbeit untersuchte Stat3. Es ist das in Säugern am weitesten verbreitete Mitglied der Stat-Familie der Transkriptionsfaktoren und wird unter anderem durch Interleukin 6 und EGFR aktiviert. Die Aktivierung erfolgt über die Janus-Kinase (JAK) und liegt in Tumoren oft dereguliert vor (Wake and Watson 2015). Die Wirkung von Stat3 ist jedoch abhängig von der Lokalisation innerhalb der Zelle (You et al. 2015). Im Zellkern fungiert Stat3 unter anderem als Regulator für die Autophagie, indem es an Beclin-1 bindet. Im Zytoplasma inhibiert es über die Bindung an die *eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2* (EIF2AK2) die Autophagie. Liegt es im Mitochondrium vor, schützt es dieses vor Mitophagie, die durch übermäßigen oxidativen Stress ausgelöst werden kann. Stat3 ist jedoch nicht nur an der Regulation von Autophagie beteiligt. Es

hat vielfältige Aufgaben, unter anderem die Regulation des Zellwachstums über die Hochregulation von Zellzyklusproteinen wie CD1 und CD3 (Chan et al. 2004). Eine Inhibierung von Stat3 begünstigt die Apoptose über eine verminderte Expression von Bcl-xL und Mcl-1 sowie eine Herunterregulation von Bcl-2, Survivin und Cyclin D1 (Iwamaru et al. 2007). Dies passt zu den Ergebnissen der Sunitinib- und Sorafenib-Behandlung. Bei beiden TKI liegt sowohl Stat3 als auch Bcl-2, Mcl-1 und Survivin überwiegend herunter reguliert vor. Dies spricht für eine Einschränkung des Wachstums und eine Aufhebung des anti-apoptotischen Status der Tumorzellen. Die Fähigkeit des Tumors in den Zellzyklus einzugreifen und dadurch selbst bei DNA-Schäden teilungsfähig zu bleiben und den verschiedenen Apoptosemechanismen zu entgehen, ist unter TKI-Behandlung deutlich vermindert.

Im Einklang mit der verminderten Fähigkeit der Tumorzellen nach TKI-Behandlung auf Stress zu reagieren, stehen auch die Ergebnisse der Untersuchung der Proteinfaltungsmaschinerie. Auch hier findet sich eine Verbindung zur Apoptose. Das 78 kDa große Glukose-regulierte Protein (GRP78, HSPA5, BiP) dient als Bindeglied zwischen ER-Stress und Apoptose. In seiner inaktiven Form liegt es gebunden an das Sensorprotein *inositol requiring enzyme 1* (IRE1), sowie an die *protein kinase RNA-like ER kinase* (PERK) und den *activating transcription factor 6* (ATF6) vor. Werden Transmembranproteine oder zu sekretierende Proteine translatiert, geht HSPA5 in seine aktive Chaperon-Form über und setzt seine drei Bindungspartner frei. Dies resultiert in der *unfolded protein response* (UPR). Mehr Chaperone werden produziert, um der Proteinlast zu begegnen (Gardner et al. 2013). Gleichzeitig erfolgt auch die Induktion der Apoptose, sollte die Proteinlast z.B. aus Mangel an ATP nicht abnehmen (Hetz 2012). In soliden Tumoren herrscht auf Grund der Unterversorgung mit Sauerstoff ein ATP-Mangel. Dies hat unter anderem auch die Aktivierung der UPR zur Folge. Um einer Apoptose-Initiierung zu entgehen, bilden die Zellen vermehrt HSPA5 (Z. Li and Li 2012), welches an die Sensorproteine bindet und über das Bcl-2 Familienmitglied Bik die Apoptose zusätzlich inhibiert (H. Zhou et al. 2011). Unter Sunitinib-Behandlung zeigte sich eine Herunterregulation von HSPA5, ebenso wie eine verminderte Expression der Chaperone HSP40, 70 und 90. HSP90 liegt in Tumorzellen in höheren Mengen vor und ist bereits für zielgerichtete Therapie-Ansätze in Betracht gezogen worden (Inhibitor Bortemozib seit 2003 zugelassen) (Van Drie 2011). Auch der Transkriptionsfaktor HSF1 wurde in zwei von drei Zelllinien bei Sunitinib-Behandlung herunter reguliert detektiert. Die Zelle ist dadurch nicht mehr in der Lage, die Menge an ungefalteten Proteinen zu kompensieren, die UPR setzt ein und die Inhibierung der Apoptose wird verhindert. Der hypoxische Status der Krebszelle bedingt die HIF-1 α regulierte Transkription der Proteindisulfidisomerase (PDI). Diese ist an der Bildung von VEGF beteiligt und bedingt dadurch eine vermehrte Angiogenese (Tanaka, Uehara, and Nomura 2000). In zwei von 3 Zelllinien sorgte die Sunitinib-Behandlung für eine Verringerung der PDI-Expression. Dies ist eine Erklärung für die verminderte Vaskularisation der Tumore nach TKI-Behandlung, was den oxidativen Stress innerhalb des Tumors verstärkt und die Zelle in die Apoptose treibt. PDI spielt zudem auch eine Rolle bei der Metastasierung. Integrine, die für die Zell-Zell-Interaktion essentiell sind, sind auf die PDI angewiesen (May et al. 2005). In Gliomzellen und Weichteilsarkomen konnte die PDI-Expression mit der Invasion bzw. Metastasierung in Verbindung gebracht werden (Goplen et al. 2006).

Die Sunitinib-vermittelte starke Hochregulation von Calnexin ist nicht so leicht erklärbar. Wie HSPA5 ist Calnexin vor allem an der Faltung sekretorischer Proteine beteiligt und bindet an

glykosylierte Peptide. Calnexin ist in der ER-Membran eingebettet (Peterson et al. 1995). Bcl-2 Proteine, die an der UPR beteiligt sind, lokalisieren nicht nur in der Mitochondrienmembran, sondern auch in der ER-Membran sowie im Zellkern. Da diese Proteine die Calcium-Balance des ERs beeinflussen, könnten sie auch Auswirkungen auf das Ca²⁺-abhängige Calnexin haben (Su et al. 2014). In der Literatur findet sich bisher kein Zusammenhang zwischen Apoptose-Regulation und Glykoproteinsynthese in Tumoren. In *adipose-derived stem cells* konnte jedoch ein Zusammenhang zwischen Bcl-2 Überexpression und vermehrter Sekretion von Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden, um Sauerstoff- und Nährstoffmangel zu begegnen (Cui et al. 2015). Die Hochregulation von Calnexin könnte also als Reaktion auf die verminderte Bildung von Wachstumsfaktoren unter Sunitinib-Behandlung verstanden werden. In Hefen wurde ein Zusammenhang zwischen ER-Stress-induzierter Apoptose und Calnexin-Überexpression bereits beschrieben (Guérin et al. 2008). Zellen, in denen Calnexin überproduziert wurde, starben und wiesen typische apoptotische Merkmale auf. Die Experimente der Arbeitsgruppe zeigten auch einen Zusammenhang zwischen IRE1 und HSPA5 Expression und Calnexin-vermittelter Apoptose. Diese Ergebnisse sollten in Hinblick auf ihre Übertragbarkeit auf Tumorzellen weiterführend analysiert werden, um die Sunitinib-vermittelte Calnexin-Hochregulation zu erklären.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, dass sowohl die Proteinhomeostase, als auch die Apoptoseregulation unter DNA-Reparaturstress und die Autophagie unter TKI-Behandlung in Richtung Apoptose-Induktion verschoben wird.

Um weitere allgemeingültige Biomarker zur Überwachung des Ansprechens auf die Behandlung mit den TKI Sorafenib, Sunitinib und Axitinib zu finden, wurden weniger gezielte Untersuchungen der proteomischen Veränderungen innerhalb der Zelle nach Behandlung mit den TKI mittels der 2D-Gelelektrophorese (Klose 1975) durchgeführt. Für die Modellzelllinie MZ1257RC konnten insgesamt 34 differentiell synthetisierte Proteine identifiziert werden (Tabelle 5.3). Jedoch konnte keines dieser Proteine auf mRNA-Ebene oder mittels *Western Blot* verifiziert werden.

6.1.2 potentielle extrazelluläre Biomarker

Biomarker zur Überwachung von Behandlungsverläufen sucht man vorzugsweise in Medien wie Blut und Urin, die man dem Patienten leicht entnehmen kann. Für die oben genannten intrazellulären Biomarker ist eine Biopsie des Tumors unumgänglich und birgt Risiken für den Patienten. Bei Nierentransplantationen sind Biomarkeruntersuchungen im Urin bereits Routine. Aus der Fülle der Sunitinib-regulierten Proteine, die im Zellkulturüberstand von MZ1257RC-Zellen identifiziert wurden, erscheinen drei Proteine als mögliche Biomarker besonders interessant: 14-3-3 Protein ζ/δ (↓), Peroxyredoxin 2 (↓) sowie Osteonektin (SPARC)(↑).

Das exosomal sekretierte Protein 14-3-3 ζ/δ ist ein Mitglied der hochkonservierten 14-3-3 Proteinfamilie, welche an der Regulation verschiedenster zellulärer Prozesse, wie Proliferation, Zellzyklus, Apoptose sowie des Zytoskeletts beteiligt ist. Als Adapterproteine sind sie auch in der Lage, verschiedene Tumorsuppressor- und Onkogenprodukte zu regulieren (Tzivion et al. 2006). 14-3-3 ζ/δ im Speziellen ist an der Regulation des *wingless-int-1* (WNT)- Signalweges beteiligt und dadurch an der Regulation von Metastasierung und Tumorprogression (Dovrat et al. 2014). Es wird in der Literatur als im NZK häufig überproduzierte Protein beschrieben (Youn 1999). Die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene Herunterregulation von 14-3-3 ζ/δ , lässt auf eine Verminderung der Metastasierung und der Proliferation der Tumorzellen durch Sunitinib-Behandlung schließen.

Das unter Sunitinib-Behandlung als herunter reguliert identifizierte Protein Peroxyredoxin 2 dient nicht nur der H₂O₂-Detoxifikation, sondern ist auch in der Redox-Signaltransduktion involviert (Poole, Hall, und Nelson 2011). In diversen Krebsarten wurden erhöhte Peroxyredoxin 2-Konzentrationen detektiert (Checoni et al. 2015). Weiterhin wird Peroxyredoxin 2 mit der Metastasierung und Resistenz gegenüber der H₂O₂-induzierten Apoptose in Verbindung gebracht (Lu et al. 2014). Eine durch Hyperoxidation verursachte Polymerisation von Peroxyredoxinen führt zur Bildung von Chaperon-ähnlichen Strukturen (Jang et al. 2004). Eine solche Struktur von Peroxyredoxin 2 konnte mit dem Zellzyklusarrest bei H₂O₂-Stress assoziiert werden. Sind die reaktiven Sauerstoffspezies entfernt, wird der Zyklusarrest durch die reduzierten Proteinspezies wieder aufgehoben (Phalen et al. 2006).

Das eindeutig der extrazellulären Matrix zuzuordnende Osteonektin (*Secreted protein acidic and rich in cysteine*, SPARC) spielt eine wichtige Rolle in der Metastasierung von Tumoren. Es fungiert als Bindeglied zwischen Zelle und Matrix und ist daher involviert in die Adhäsion, Proliferation und Migration von Zellen (Brekken und Sage 2001). SPARC liegt in vielen Tumoren dereguliert vor. Im Kolonkarzinom, Melanom oder Mammakarzinom ist SPARC im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe hochreguliert (Framson und Sage 2004), was mit einer verstärkten Invasivität und Metastasierung korreliert (Arnold et al. 2008). Im Gegensatz dazu führt eine erhöhte SPARC-Expression im Ovarialkarzinom zur Apoptoseinduktion (Brown et al. 1999). Im Pankreaskarzinom ist die Expression von SPARC durch Promotormethylierung inhibiert, wohingegen infiltrierende Stromazellen eine erhöhte SPARC-Expression aufweisen (Sato et al. 2013). Blasenkrebs zeigt bei Verlust von SPARC eine verstärkte Karzinogenese (Said et al. 2013). Im primitiven neuroektodermalen Tumor (PNET) wurde eine Verringerung von Invasion und Migration bei erhöhten SPARC-Expressionen nachgewiesen. Die Arbeitsgruppe um Sailaja verweist auf eine Regulation der Eigenschaften von SPARC durch Wachstumsfaktoren, Integrinen und anderen Faktoren. Die genauen Mechanismen sind noch unbekannt und scheinen stark vom Ursprungsgewebe des Tumors abzuhängen. Dieselbe Arbeitsgruppe konnte für PNET-Zellen einen Zusammenhang zwischen SPARC-Überexpression und Autophagie-induzierter Apoptose beobachten (Sailaja et al. 2013). Die starke Hochregulation während der Sunitinib-Behandlung in der Zelllinie MZ1257RC könnte ebenfalls mit der Apoptoseinduktion zusammenhängen. Genauere Untersuchungen, wie die Regulation von SPARC im NZK im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe sowie die resultierenden Auswirkungen auf die Migration und Invasion, sollten im Fokus künftiger Projekte stehen.

6.2 Wirkung von TKIs auf T-Zellen

Es ist hinreichend belegt, dass Tumore ihre zelluläre Umgebung beeinflussen. Beispielsweise regt die verstärkte Sekretion von Wachstumsfaktoren Epithelzellen zur Neoangiogenese an. Zusätzlich steigt die Zahl von MDSC und Tumor-spezifischen Tregs an, was die Immunantwort negativ beeinflusst (Seliger et al. 2010). Da die Zielstrukturen der TKI keine Tumor-spezifischen Kinasen sind, werden auch andere Zellen beeinflusst werden. Es besteht ein Zusammenhang zwischen TKI-Behandlung und Vaskulopathie und der damit ausgelösten Unterversorgung des NZK-Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen (Tsuzuki et al. 2014). Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch Sorafenib-Behandlung eine Reduktion der Anzahl von Tregs, sowie CD8⁺ T-Zellen detektiert. Dies steht im Widerspruch zu Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Hipp (Hipp et al.

2008). Sie konnten keine Reduzierung von CD8⁺ T-Zellen nach Sorafenib-Behandlung in Mäusen nachweisen. Lediglich die Induktion der Antigen-spezifischen T-Zellen wurde durch Sorafenib-Gabe reduziert. Zudem konnte in der hier vorliegenden Arbeit eine Herunterregulation des C-C-Motiv Chemokinrezeptor 7 (CCR7) nachgewiesen werden. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits für dendritische Zellen gezeigt (Hipp et al. 2008). CCR7 führt die T-Zellen mittels eines C-C-Motiv Ligand 21 (CCL21) Gradienten aus dem peripheren Gewebe in lymphatische Gefäße (Bromley, Thomas, and Luster 2005), wo sie dem *activation induced cell death* (AICD) unterliegen. Dieser Prozess eliminiert autoreaktive T-Zellen durch negativ-Selektion. Liegt CCR7 herunter reguliert vor, kehren die T-Zellen nicht ins lymphatische Gewebe zurück, sondern verbleiben im Gewebe. CCR7⁻ T-Zellen wurden daher bereits für die Therapie mit *redirected T-Cells* untersucht (Hombach et al. 2013). Auch der Differenzierungsmarker CXCR3 wurde durch Sorafenib-Behandlung herunter reguliert. Er wird auf B-, NK- und T-Zellen exprimiert (Dar and Knechtle 2007), auf letzteren besonders stark in ihrer aktivierten Form (Mohan et al. 2005). Damit wirkt Sorafenib negativ auf die Aktivierung von T-Zellen. Axitinib-behandelte Zellen zeigten indes keine verminderte CXCR3-Präsentation an der Zelloberfläche. Ein weiterer Indikator für eine verminderte T-Zell-Aktivierung unter Sorafenib-Behandlung ist die verminderte Expression der Dipeptidylpeptidase IV (CD26). Sie ist wichtig für die Co-Stimulation des T-Zell-Rezeptors (De Meester et al. 1999). Die Expression von CD26 erfolgt in Abhängigkeit der Anwesenheit von IL-2, IL-12 und IL-15 und wurde durch Sorafenib zudem auch auf CD16⁺ CD56⁺ NK-Zellen herunter reguliert (Bühling et al. 1994). Sorafenib hat also neben der Reduktion von Tregs zusätzlich einen negativen Einfluss auf die Aktivität anderer Immuneffektorzellen. Die Behandlung mit Sunitinib führte ebenfalls zu einer Reduktion der immunsuppressiven Tregs, was die Balance zugunsten einer Stimulation der Immunantwort verschiebt (Chen et al. 2005). Dies ist besonders günstig, da eine hohe Anzahl von Tregs im peripherem Blut oder innerhalb der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten mit einer schlechten Prognose für den Patienten korreliert (Fodale et al. 2011). Im Gegensatz dazu zeigte die Arbeitsgruppe um Flörcken (Flörcken et al. 2012), dass Sorafenib Tregs im peripheren Blut von NZK-Patienten induziert. Die Diskrepanz zwischen den in dieser Arbeit *in vitro* ermittelten Daten und den *in vivo* Daten aus klinischen Studien erschwert die Bewertung der in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse. Patienten könnten jedoch auf Grundlage der hier gezeigten Ergebnisse von einer Sunitinib-Behandlung profitieren. Axitinib hingegen beeinflusst die Anzahl an Tregs nicht. Auch die NK-Zell-Aktivierungsmarker CD25 und CD69 wurden von Axitinib nicht negativ beeinflusst, wohingegen sowohl Sunitinib als auch Sorafenib eine Herunterregulation verursachten. Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Herunterregulation der IFN γ -Produktion durch Sunitinib und Sorafenib nachgewiesen werden. In der Literatur wurde für Sorafenib (Flörcken et al. 2012) und Sunitinib (Gu et al. 2010) zusätzlich auch eine Reduktion der IL-2 Produktion beschrieben. Beide TKI haben also einen negativen Einfluss auf Proliferation und Funktion von T-Zellen, was für Axitinib nicht zutrifft. Weiterführend hat Axitinib sogar eine normalisierende Wirkung auf die den Tumor umgebenden Blutgefäße (Bose et al. 2012), wohingegen die Wirkung von Axitinib auf T-Zellen in der Literatur bisher nicht genauer untersucht wurde.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass alle drei untersuchten TKI die Proliferation von T-Zellen vollständig inhibieren. Jedoch führte nur die Behandlung mit Sorafenib und Sunitinib auch zu einem vollständigen Verlust der Viabilität der untersuchten Immunzellen. Im Gegensatz dazu beeinflusste die Behandlung mit Axitinib die Viabilität von CD3/CD28-stimulierten PBMCs nicht. Die Modellzelllinie Jurkat zeigte eine biphasische

Abnahme der Viabilität, jedoch mit einer hohen Restaktivität auch bei hohen Dosen. Die Behandlung mit Axitinib hemmt demnach zwar die Zellteilung, wirkt aber im Gegensatz zu Sorafenib und Sunitinib auch in nicht physiologischen Konzentrationen im untersuchten Zeitintervall *in vitro* nicht zytotoxisch auf T-Zellen. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits für den EGFR-Inhibitor Gefitinib gezeigt, der die Inhibierung der Proliferation durch einen Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase hervorruft (Zhou et al. 2009). Die Zellen treten somit in eine dauerhafte Ruhephase (G1-Phase) ein bzw. verlieren ihre Fähigkeit zur Zellteilung ähnlich zu differenzierten Zellen (G0-Phase). Ein G1/G0-Arrest wurde auch für Sunitinib und Sorafenib in der Literatur bereits beschrieben (Flörcken et al. 2012; Gu et al. 2010). Für Axitinib konnte im Gegensatz dazu im Rahmen dieser Arbeit ein Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase detektiert werden. Die Behandlung des NZK mit *retinoic acid chalcone* (RAC) zeigt ebenfalls einen G2/M-Arrest (Li et al. 2015). Morelli et al. konnten für NZK Zellen eine Induktion von oxidativen DNA-Schäden nach Axitinib-Behandlung nachweisen, was mit einer erhöhten *DNA Damage Response* (DDR) und ebenfalls einem G2/M Arrest einherging (Morelli et al. 2015). In den Tumorzellen resultiert der Arrest in der Initialisierung von Apoptose. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, trifft dies für Axitinib-behandelte T-Zellen nicht zu. Es konnte zwar eine Aktivierung von Caspase 3 schon bei Axitinib-Konzentrationen $< 5 \mu\text{M}$ nachgewiesen werden jedoch wurde innerhalb von 72 h keine Translokation von Annexin V zur Außenseite der Zellmembran detektiert. Für Sunitinib und Sorafenib konnte Annexin V ab Konzentrationen von $5 \mu\text{M}$ (Sunitinib) und $10 \mu\text{M}$ (Sorafenib) an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Dies könnte durch die Initialisierung unterschiedlicher Apoptosewege erklärt werden. Daher wurden die der Caspase 3 vorgeschalteten Caspasen 8 und 9 und Änderungen im mitochondrialen Membranpotential nach TKI-Behandlung untersucht.

Caspase 8 und 9 werden durch unterschiedliche pro-apoptotische Signale aktiviert und induzieren anschließend die Aktivierung der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7, die dann den aktiven Zerfall der Zelle einleiten. Dabei unterscheidet man zwei verschiedene Typen der Apoptose-Induktion. Typ I, der extrinsische Signalweg, wird über Ligandenbindung an Todesrezeptoren der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptorfamilie (z.B. CD95) vermittelt. Als Liganden wirken hierbei verschiedene Zytokine, wie der Fas-Ligand oder Perforin. Der durch die Bindung trimerisierte Rezeptor rekrutiert Adaptermoleküle, wie TRADD (TNF-Rezeptor-assoziierte Protein) und FADD (Fas-assoziierte Protein mit Todesdomäne), die ihrerseits u.a. die Initiator-Caspase 8 bindet. Diese spaltet sich durch die hohe lokale Konzentration autoproteolytisch und wird dadurch aktiviert. Daneben existiert der intrinsische Apoptoseweg (Typ II). Dieser wird durch Schädigung der DNA (Expression von p53) im Zellkern oder in den Mitochondrien ausgelöst. Nach der Synthese verschiedener pro-apoptotisch wirkender Proteine der Bcl-2 Familie (z.B. Bax und Bad) erfolgt die Freisetzung von Cytochrom *c*, durch Permeabilisierung der Mitochondrienmembran. Cytochrom *c* bindet an Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) und induziert dadurch eine Konformationsänderung, die die Caspase-Rekrutierungs-Domäne (CARD) zugänglich macht. Nach Bindung der Pro-Caspase 9 an diese Domäne erfolgt die autoproteolytische Spaltung in die aktive Form. Es existiert außerdem eine Mischform beider Apoptosewege. Über ein weiteres Mitglied der Bcl-2 Familie (Bid) kann der extrinsische Weg über den intrinsischen verstärkt werden, indem Caspase 8 Bid spaltet und *truncated Bid* (tBid) die pro-apoptotischen Proteine der Mitochondrien-vermittelten Apoptose aktiviert (Elkholi et al. 2014; Hengartner 2000). Ab Konzentrationen von $10 \mu\text{M}$ konnte für Sunitinib und Sorafenib eine deutliche Zunahme von aktivierter Caspase 8 und 9 nachgewiesen werden. Für Axitinib wurde bereits bei Konzentrationen $< 5 \mu\text{M}$ eine Aktivierung beider

Caspasen detektiert, jedoch sinkt deren Aktivität mit steigenden Axitinib-Konzentrationen innerhalb der Versuchsdauer wieder. Eine eindeutige Unterscheidung der Apoptosewege konnte so also nicht getroffen werden. Caspase 8 kann zudem auch unabhängig von Todesrezeptoren aktiviert werden. Es wurde bereits beschrieben, dass TKI-Behandlung zur Proteolyse von Caspase 8 führen kann, durch post-mitochondriale Caspase 3-Aktivierung, damit also über den intrinsischen Weg (Sohn, Schulze-Osthoff und Jänicke 2005). Sunitinib und Sorafenib zerstören das mitochondriale Membranpotential Dosis-abhängig. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese TKI den intrinsischen Apoptoseweg über die Schädigung der Mitochondrien initiieren. Die Deregulation des Membranpotentials und die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran sind zwei unabhängige Vorgänge. Nur die Deregulierung des Membranpotentials ist *in vivo* abhängig von der Aktivierung von Caspase 9 (Samraj et al. 2007). Selbst bei Konzentrationen von 10 μ M Axitinib, blieb das Membranpotential erhalten, obwohl eine Aktivierung von Caspase 9 nachgewiesen wurde. Verantwortlich dafür könnte die Überproduktion des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1 nach Axitinib-Behandlung sein. Es ist beschrieben, dass Mcl-1 während der Mitose sein Expressionsmaximum erreicht (Harley et al. 2010), was zum detektierten G2/M Arrest unter Axitinib-Behandlung passt. Mcl-1 ist zusammen mit Bcl-xL an der Inhibierung der Permeabilisierung der Mitochondrienmembran beteiligt (Andersen and Kornbluth 2012; Vander Heiden et al. 1997). Dies könnte auf eine temporäre Blockierung der Apoptose-Induktion unter Axitinib-Behandlung hinweisen. Für Sorafenib hingegen wurde bereits eine Reduktion der Mcl-1-Expression durch die Induktion von ER-Stress und der daraus resultierenden Inhibierung der Translation beschrieben, was zur Destabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials führt (Rahmani et al. 2007; C. Yu et al. 2005). Auch in dieser Arbeit konnte in T-Zellen aus PBMCs eine Herunterregulation der Mcl-1 sowie der Bcl-xL Expression nach Sorafenib- und Sunitinib-Behandlung nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Proteom-Analysen konnten nicht hinreichend validiert werden und brachten unter physiologischen Bedingungen keine signifikanten Hinweise auf die Wirkweise von TKI auf T-Zellen. Die Identifizierung zweier Peroxyredoxine gibt jedoch einen Hinweis auf die Bedeutung des Redox-Status der Zelle. Induzierter ROS-Stress und damit in Verbindung stehend auch die Redox-Signaltransduktion, könnte von der TKI-Behandlung beeinflusst werden. Peroxyredoxin 1, welches unter nicht-physiologischen Konzentrationen an Axitinib hoch reguliert vorliegt, wurde bereits in Plasmazellen als Antioxidans beschrieben (Demasi et al. 2007). Wie schon für Peroxyredoxin 2 innerhalb des Tumor-Sekretoms beschrieben, wird es benötigt, um der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies entgegen zu wirken. Es ist aber auch in der Diskussion, in die Redox-Signaltransduktion involviert zu sein (Poole und Nelson 2008) und könnte damit bei der Aktivierung/Inhibierung von Immunzellen eine Rolle spielen. Peroxyredoxin 3 ist im Mitochondrium lokalisiert und wurde bereits für Tumorzellen als Schutz vor Behandlungs-bedingtem oxidativem Stress beschrieben (Nonn, Berggren, und Powis 2003). In Tumorzellen wird es jedoch zu diesem Zweck hoch reguliert. In Anwesenheit von Sunitinib wird Peroxyredoxin 3 in Jurkat-Zellen jedoch herunter reguliert, was darauf hindeutet, dass Sunitinib einen negativen Einfluss auf T-Zellen ausübt. Die Fähigkeit, auf oxidativen Stress zu reagieren, wird eingeschränkt, was zur Apoptose-Initialisierung führen kann.

Zusammenfassend gilt, dass Axitinib weniger negative Auswirkungen auf T-Zellen hat als Sunitinib und Sorafenib. Es inhibiert zwar die T-Zell-Expansion, jedoch bleiben die T-Zellen vital. Im Mausmodell konnte für Axitinib eine Verminderung der Anzahl an Tregs in Verbindung mit

einer Peptid-basierten Vakzinierung beobachtet werden (Bose et al. 2012). Sunitinib und Sorafenib beeinflussen beide eine Tumor-gerichtete Immunantwort negativ. Viabilität, Proliferation und IFN γ -Produktion werden inhibiert. Sorafenib scheidet aufgrund seiner negativen Wirkung auf T-Zellen bei Einsatz physiologischer Konzentrationen als Therapieoption für eine Kombination mit Immuntherapien aus. Aber auch Sunitinib reduziert bei Einsatz physiologischer Konzentrationen die Aktivität von T-Zellen. Auch wenn es Hinweise auf eine positive Wirkung einer Sunitinib-Behandlung in Kombination mit therapeutischen Immuntherapien im Mausmodell gibt (Bose et al. 2011), sprechen die Daten dieser Arbeit jedoch gegen eine solche Kombination. Axitinib erscheint als der beste Kandidat für eine Kombination mit Immuntherapien, wie der Gabe von konditionierten T-Zellen.

6.3 Aufklärung der Resistenzentwicklung gegenüber Sunitinib im NZK

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Sunitinib-adaptierten Zellen, sollten als Modellsystem für die Untersuchung von möglichen Resistenzmechanismen gegenüber diesem TKI dienen. Wie im Ergebnisteil beschrieben, wurde mit unterschiedlichen Methoden versucht, resistente Zellen zu generieren. Dies ist nur unvollständig gelungen. Die Zelllinien haben sich reversibel an die Sunitinib-Behandlung gewöhnt, wurden aber nicht resistent. Die IC₅₀-Werte konnten auf das 2-3 fache der Wildtyp-Werte erhöht werden und die Zellen starben erst nach viel längeren Behandlungsdauern ab. Bubnoff et al. haben 2005 eine Erhöhung der IC₅₀-Werte um das 12-fache für den TKI Imatinib in Zellen der chronisch myeloiden Leukämie nachgewiesen, wenn im Zielprotein von Imatinib, Bcr-Abl, eine Punktmutation vorlag (von Bubnoff et al. 2005). Trotz der Behandlung mit N-Ethyl-Nitrosoharnstoff (ENU) ist bei einer so geringen Erhöhung der IC₅₀-Werte, wie im hier untersuchten System, nicht von der Etablierung von Mutationen in den Zielgenen der TKIs auszugehen. Die Sequenzierung des Genoms der etablierten Sunitinib-adaptierten Modellzelllinien könnte Aufschluss auf etwaige Mutationen geben, konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

Allerdings ist eine Fokussierung auf Mutationen bei der Aufklärung von Resistenzmechanismen eine einseitige Herangehensweise. Die Tumorzelle selbst und ihre Einbettung in ein zelluläres Mikromilieu gestalten die Aufklärung der Resistenzmechanismen weitaus komplexer. Schon die Untersuchung in der Zellkultur zeigt deutliche Unterschiede in der Reaktion der Zellen auf die verwendeten Wirkstoffe. Die klinisch wirksamen physiologischen Konzentrationen an Sunitinib (0,06-0,1 μ M) und Axitinib (0,1-0,2 μ M) werden in der Zellkultur weit überschritten. Das Mikromilieu spielt gerade bei einem hypervaskularisierten Tumor wie dem NZK eine entscheidende Rolle. Inflammatorische Leukozyten, wie Makrophagen und Granulozyten werden von im Tumor herrschenden hypoxischen Bedingungen angezogen und dort zur Bildung von NF- κ B angeregt (Aller, Arias, und Arias 2004). Dies begünstigt die TNF- α -Produktion innerhalb der Tumorzelle und so die Proliferation (Kulbe et al. 2004). Dies steht in Konkurrenz zur TKI-induzierten Proliferationsinhibierung und Apoptoseaktivierung.

Die Tumorzelle hat zudem *in vivo* verschiedene Möglichkeiten, auf den Selektionsdruck durch die Behandlung mit den TKIs zu reagieren. Eine Möglichkeit ist die Vermeidung des Drucks, indem sie einen Ortswechsel vollzieht. Einige der in diesem Kontext gefundenen differenziell synthetisierten Proteine sprechen für diese Taktik. Die Untereinheit des mitochondrialen Atmungskettenkomplex I NADH-Dehydrogenase-[Ubichinon]-Eisen-Schwefelprotein 3 (NDUFS3) wurde bereits im Mammakarzinom untersucht (Suhane, Berel, und

Ramanujan 2011). Eine Herunterregulation dieses Proteins hat eine Abnahme von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zur Folge, was wiederum zur verstärkten Migration und Invasion der Brustkrebszellen führte. Auch die Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix wurde von der verminderten ROS-Produktion migrationsbegünstigend beeinflusst (He et al. 2013). Außerdem wirkt die verringerte ROS-Produktion auf den intrinsischen Apoptoseweg regulierend. Huang et al. beobachteten, dass eine Herunterregulation von NDUFS3 die von Interferon und Retinsäure ausgelöste Apoptose inhibiert, da resultierend aus der Inhibierung der mitochondrialen Atmungskette weniger ROS produziert werden (Huang et al. 2007). Auch die Hochregulation der Thioredoxinreduktase 1 (TXNRD1) spricht für eine Anpassung der adaptierten Zellen an eine erhöhte Produktion von ROS. TXNRD1 fungiert als Redox-Sensor (Sun and Gladyshev 2002) und reduziert Thioredoxin, was unter anderem zur Transkription von Faktoren führt, die dem schädlichen Einfluss von ROS in der Zelle entgegenwirken (Arnér und Holmgren 2006).

Ein starkes Indiz dafür, dass die Migration bei der Entwicklung von TKI-Resistenzen eine Rolle spielt, ist die Herunterregulation von ERp29 in den Sunitinib-adaptierten Zellen. Eine verstärkte Expression von ERp29 verursacht eine Hochregulation der epithelialen Markerproteine E-Cadherin und Cytokeratin 19 in Brustkrebszellen (Bambang et al. 2009). Mesenchymale Marker wie Vimentin, Fibronectin und N-Cadherin hingegen werden herunter reguliert (Bambang et al. 2009). Es ist demnach an der Regulierung der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT) und auch dem umgekehrten Prozess (MET) beteiligt. ERp29 ist im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert. Es wird ubiquitär in allen Säugerzellen exprimiert, mit einer erhöhten Konzentration in sekretorischen Organen wie Drüsengewebe, Pankreas und Leber (Mkrtchian and Sandalova 2006). Obwohl ERp29 mit Proteindisulfidisomerasen (PDI) verwandt ist, fehlt ihm eine aktive Thioredoxin-domäne mit CC-Motiv (Liepinsh et al. 2001). Es ist zwar im ER-Lumen lokalisiert, jedoch fehlen posttranslationale Modifikationen und es ist weder ATP- noch Ca^{2+} -abhängig (Ferrari et al. 1998). Seine Funktion besteht im ER hauptsächlich in der Entfaltung und Sekretion von Proteinen (Mkrtchian und Sandalova 2006). Da es kein ER-Stresselement in seiner Promotorregion besitzt (CCACG), wird es unter ER-Stress nicht direkt in seiner Expression reguliert. E2F und CREB2 Bindestellen deuten jedoch auf eine Aktivierung über eine p38-gekoppelte Stressantwort hin. Da CREB-Überexpression in Tumoren eine wichtige Rolle spielt, ist auch die Expression von ERp29 in diesem Kontext zu beachten. Behandlungsansätze mit dem Ziel der DNA-Schädigung, wie etwa Bestrahlung (Zhang et al. 2008), Homocystein-Behandlung (Hung et al. 2009) oder Doxorubicin-Behandlung (Farmaki et al. 2011) führen zu einer verstärkten Synthese von ERp29. Aber auch ER-Stress induzierender Nährstoffmangel, oxidativer Stress und Wachstumshormonüberschuss führen zur Produktion höherer Mengen ungefalteter Proteine und damit zur Expression von höheren Mengen ERp29 (Ron und Walter 2007). Die Zelle versucht dem Stress zu entgehen, indem sie in den G0/G1-Zellzyklusarrest tritt. ERp29 ist durch eine Verringerung der Zellzyklusproteine D1/D2 an diesem Prozess beteiligt (Zhang und Richardson 2011). Dies begünstigt die Resistenz der Zellen gegenüber Chemotherapeutika. Im Rahmen dieser Arbeit konnte auch ein Anstieg der ERp29-Expression für die Behandlung mit TKI in sensitiven Zellen gezeigt werden (Abb. 5.28, Kapitel 5.3.4). In den adaptierten Zelllinien ist jedoch eine Herunterregulation zu beobachten (Faktor 0.4). Die ERp29-vermittelte Kontrolle der EMT/MET könnte demnach bei der Entwicklung von Resistenzen eine tragende Rolle spielen. Es konnte bereits für verschiedene epitheliale Tumore eine Abhängigkeit zwischen ERp29-Expression und dem Tumor-Grad nachgewiesen werden. Sinkt die ERp29-Konzentration, steigt der Tumor-Grad und damit verschlechtert sich die

Prognose des Patienten (Shnyder, Mangum, and Hubbard 2008). Die adaptierten Zellen könnten also versuchen dem therapeutischen Druck durch EMT zu entgehen. Dafür spricht, dass die adaptierten NZK-Zelllinien MZ1257RC und MZ2905RC in der Zellkultur bereits einen „destabilisierten“ Phänotyp zeigen. Sie verlieren ihre Polarität, ihre Form ist diffus und sie lösen sich sehr leicht vom Untergrund. Auch die auf Proteombasis untersuchte Kolonkarzinom-Modellzelllinie HCT116 zeigte diese phänotypischen Veränderungen. Um Fern-Metastasen zu bilden, muss die Zelle ihren epithelialen Charakter verlieren und in die mesenchymale Form wechseln. Auch dafür ist ERp29 essentiell. Eine starke und stabile Hochregulation konnte in Melanomzellmetastasen nachgewiesen. Diese sorgt dafür, dass die Metastasen gerade von instabilen Primärtumoren am „neuen“ Standort extrem stabil sind (Linge et al. 2012), jedoch auch resistenter gegenüber der Behandlung mit Chemotherapeutika (Farmaki et al. 2011). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass beim bereits metastasierten NZK, die Ansprechraten auf die TKI-Behandlung limitiert sind, wohingegen Primärtumore gut ansprechen, mit verminderten Wachstumsraten (G0/G1-Arrest) und geringerer Metastasierung. Die Expressionsraten von ERp29 in Primärtumoren und Metastasen könnten damit unterschiedliche Auswirkungen auf das Ansprechen von TKI haben. Weiterführende Untersuchungen mit ERp29 knock-out Zellen könnten den Einfluss von ERp29 auf die TKI-Resistenzentwicklung aufklären.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 3 NZK Zelllinien hinsichtlich ihrer intra- und extrazellulären proteomischen Veränderungen unter TKI-Behandlung untersucht. Es konnten auf diesem Wege jedoch keine allgemeinen Biomarker für alle 3 Zelllinien identifiziert werden. Es wurden jedoch Hinweise auf Regulationen spezifischer Stoffwechselwege gefunden, die eine genauere Untersuchung dieser rechtfertigten. Dabei wurden die an der Apoptose beteiligten Proteine Survivin und Mcl-1 in allen 3 Zelllinien unter Behandlung aller drei untersuchten TKI herunter reguliert. Ihr Einsatz als Biomarker für die Behandlungsüberwachung des NZK ist daher möglich und sollte *in vivo* weiter untersucht werden. Für die Sunitinib-Behandlung wurden außerdem der VEGFR-abhängige Transkriptionsfaktor Stat3, sowie die an der Proteinfaltung beteiligten Proteine HSP40 und HSPA5 in allen drei untersuchten Zelllinien herunter reguliert vorgefunden. Diese Proteine könnten für die Überwachung des Behandlungsverlaufs von Sunitinib als Biomarker genutzt werden und sollten ebenfalls *in vivo* untersucht werden. Alle drei untersuchten TKI hatten Einfluss auf die Synthese von Proteinen der Proteinfaltungsmaschinerie, wenn auch sehr heterogen. Weiterführende Studien zur Regulation der Proteinfaltung bei TKI-Behandlung, könnten das Verständnis der Wirkweise vervollständigen und damit auch neue Zielstrukturen für die gezielte Behandlung des NZK aufzeigen. Die hohe Anzahl an differentiell synthetisierten Proteinen im Sekretom gibt Anlass dieses näher zu untersuchen. Die mögliche negative Beeinflussung der Metastasierung durch Herunterregulation von 14-3-3 ζ/δ und Hochregulation von SPARC nach Sunitinib-Behandlung sollte näher untersucht werden. Die Untersuchung der Expression von EMT-Markern, wie Vimentin und Ezrin, sowie ERp29 könnten Aufschluss über die Wirkung von Sunitinib auf die Metastasierung geben. Eine Unterscheidung zwischen löslichen, sezernierten Proteinen und in Membranvesikeln „verpackte“ Proteine konnte innerhalb dieser Arbeit nicht erfolgreich beendet werden. Durch geeignete Präparationsmethoden, wie die Isolierung der Exosomen durch Ultrazentrifugation und anschließender Untersuchung beider Fraktionen auf differentiell synthetisierte Proteine könnten weitere Rückschlüsse auf die Wirkung der TKI hinsichtlich der Modulation des Tumormikromilieus getroffen werden. Dies ist jedoch mit einem sehr hohen Materialaufwand verbunden und sollte in geeigneten Bioreaktoren durchgeführt werden, um adäquate Mengen an Zellkulturüberstand zu erhalten. Der Einsatz neuer Methoden für die quantitative Analyse von Proteinen im Western Blot bieten für Tumorzellen verbesserte Untersuchungsbedingungen. Die hohe Variabilität der Proteinsynthese, macht das Finden von unregulierten Proteinen als Referenz im quantitativen Western Blot sehr schwer. Neuere Technologien, die das Gesamtprotein jeder Probe als Referenz zugänglich machen, könnten die Untersuchung der differentiellen Proteilmuster verbessern.

Hinsichtlich der Untersuchungen von Immunzellen zeigte sich, dass Sorafenib den größten Einfluss auf diese ausübt. Es reduziert die Anzahl von regulatorischen T-Zellen, was durchaus positiv für die Behandlung des NZK ist. Leider reduziert es aber auch die Anzahl an zytotoxischen T-Zellen und hemmt Aktivität und Differenzierung der Immunzellen. Dies ist bei der Behandlung des NZK von Nachteil. Für Sunitinib konnte hingegen nur eine Reduktion der Tregs nachgewiesen werden. Weder Sunitinib noch Axitinib zeigten unter Verwendung physiologischer Konzentrationen einen Einfluss auf Aktivität und Differenzierung. Die Untersuchungen innerhalb dieser Arbeit beschränkten sich auf aktivierte Immunzellen gesunder Spender und die Modellzelllinie Jurkat. Die Untersuchung der Immunzellen von NZK-Patienten,

speziell der Tumor-infiltrierenden T-Lymphozyten, ist der nächste logische Schritt. Dabei sollte der Einfluss der TKI auf Anzahl, Differenzierung und Aktivierung auf weitere Subpopulationen von Immunzellen erweitert werden. Gerade ein Einfluss auf MDSCs könnte Aufschluss über die Ursachen von Rückfällen der Patienten bringen, vor allem im Hinblick auf die Angiogenese und Inaktivierung von Effektorzellen. Neueste Therapieansätze, wie der Einsatz konditionierter T-Zellen oder die Vakzinierung mit DCs, könnten mit der Behandlung mit TKI's kombiniert werden. Axitinib scheint auf Grundlage der hier gezeigten Ergebnisse ein geeigneter Kandidat für eine solche Kombination zu sein und sollte dahingehend *in vivo* untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es nicht gelungen, TKI-resistente NZK-Zelllinien zu etablieren. Es konnten jedoch Sunitinib-adaptierte Kolonkarzinomzelllinien generiert werden, die eine Langzeitkultivierung mit bis zu 3-fachem IC_{50} -Werte für Sunitinib zuließen. Die adaptierten Zellen zeigten keine Induktion der Apoptose unter Sunitinib-Langzeitbehandlung mehr. Untersuchungen des Proteoms zeigten vor allem Veränderungen in der Stressantwort dieser Zellen im Vergleich mit den korrespondierenden Sunitinib-sensitiven Zellen. Besonders interessant ist das an der Stressantwort beteiligte Protein ERp29. Es wird derzeit sowohl als Tumorverstärker als auch als Tumorsuppressor diskutiert und sollte für das NZK näher untersucht werden. Vor allem die mögliche Rolle von ERp29 bei der Metastasierung und der TKI-Resistenz von Metastasen macht die Syntheseraten dieses Proteins interessant für die Verlaufskontrolle von TKI-Behandlungen und die Aufklärung von Resistenzmechanismen. Weiterführende Untersuchungen nach Herstellung ERp29-transfizierter NZK-Zellen sowie die sh-Plasmid-vermittelte Herunterregulation von ERp29 in verschiedenen NZK-Modellzelllinien waren angedacht, überstiegen jedoch den zeitlichen Rahmen der vorliegenden Arbeit.

Literaturverzeichnis

- Algaba, Ferran et al. 2011. "Current Pathology Keys of Renal Cell Carcinoma." *European urology* 60(4): 634–43.
- Aller, Maria-Angeles, Jorge-Luis Arias, and Jaime Arias. 2004. "Post-Traumatic Inflammatory Response: Perhaps a Succession of Phases with a Nutritional Purpose." *Medical hypotheses* 63(1): 42–46.
- Amaravadi, Ravi K et al. 2011. "Principles and Current Strategies for Targeting Autophagy for Cancer Treatment." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17(4): 654–66.
- Andersen, J L, and S Kornbluth. 2012. "Mcl-1 Rescues a Glitch in the Matrix." *Nat Cell Biol* 14(6): 563–65.
- Arnér, Elias S J, and Arne Holmgren. 2006. "The Thioredoxin System in Cancer." *Seminars in cancer biology* 16(6): 420–26.
- Arnold, Shanna et al. 2008. "Forced Expression of MMP9 Rescues the Loss of Angiogenesis and Abrogates Metastasis of Pancreatic Tumors Triggered by the Absence of Host SPARC." *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 233(7): 860–73.
- Aveic, Sanja, Martina Pigazzi, and Giuseppe Basso. 2011. "BAG1: The Guardian of Anti-Apoptotic Proteins in Acute Myeloid Leukemia." *PloS one* 6(10): e26097.
- Awada, A et al. 2005. "Phase I Safety and Pharmacokinetics of BAY 43-9006 Administered for 21 Days on/7 Days off in Patients with Advanced, Refractory Solid Tumours." *Br J Cancer* 92(10): 1855–61.
- Bambang, I Fon et al. 2009. "Overexpression of Endoplasmic Reticulum Protein 29 Regulates Mesenchymal-Epithelial Transition and Suppresses Xenograft Tumor Growth of Invasive Breast Cancer Cells." *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 89(11): 1229–42.
- Belmar, Johannes, and Stephen W. Fesik. 2015. "Small Molecule Mcl-1 Inhibitors for the Treatment of Cancer." *Pharmacology & Therapeutics* 145: 76–84.
- Bennett, Stuart J et al. 2015. "CD4(+) T Cell Surface Alpha Enolase Is Lower in Older Adults." *Mechanisms of ageing and development* 152: 56–62.
- Bernhard, Helga. 1996. "Reduced Density Carcinomas Membrane and Stability with Low Histocompatibility of Human LMP Expression ' Complex Renal Cell Class in a Subset." *2(August): 1427–33.*
- Berth, M, F M Moser, M Kolbe, and J Bernhardt. 2007. "The State of the Art in the Analysis of Two-Dimensional Gel Electrophoresis Images." *Appl Microbiol Biotechnol* 76(6): 1223–43.
- Bose, A et al. 2011. "Sunitinib Facilitates the Activation and Recruitment of Therapeutic Anti-Tumor Immunity in Concert with Specific Vaccination." *Int J Cancer* 129(9): 2158–70.
- Bose, A, D B Lowe, A Rao, and W J Storkus. 2012. "Combined Vaccine+axitinib Therapy Yields Superior Antitumor Efficacy in a Murine Melanoma Model." *Melanoma Res* 22(3): 236–43..

- Bose, Anamika, Devin B Lowe, Aparna Rao, and Walter J Storkus. 2012. "Combined Vaccine+axitinib Therapy Yields Superior Antitumor Efficacy in a Murine Melanoma Model." *Melanoma research* 22(3): 236–43.
- Bradeen, Heather A et al. 2006. "Comparison of Imatinib Mesylate, Dasatinib (BMS-354825), and Nilotinib (AMN107) in an N-Ethyl-N-Nitrosourea (ENU)-Based Mutagenesis Screen: High Efficacy of Drug Combinations." *Blood* 108(7): 2332–38.
- Bradford, M M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Anal Biochem* 72: 248–54.
- Brekken, R A, and E H Sage. 2001. "SPARC, a Matricellular Protein: At the Crossroads of Cell-Matrix Communication." *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 19(8): 816–27.
- Bromley, Shannon K, Seddon Y Thomas, and Andrew D Luster. 2005. "Chemokine Receptor CCR7 Guides T Cell Exit from Peripheral Tissues and Entry into Afferent Lymphatics." *Nature immunology* 6(9): 895–901.
- Brown, T J et al. 1999. "Activation of SPARC Expression in Reactive Stroma Associated with Human Epithelial Ovarian Cancer." *Gynecologic oncology* 75(1): 25–33.
- von Bubnoff, Nikolas et al. 2005. "A Cell-Based Screening Strategy That Predicts Mutations in Oncogenic Tyrosine Kinases: Implications for Clinical Resistance in Targeted Cancer Treatment." *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 4(3): 400–406.
- Bühling, F et al. 1994. "Expression and Functional Role of Dipeptidyl Peptidase IV (CD26) on Human Natural Killer Cells." *Natural immunity* 13(5): 270–79.
- Candiano, Giovanni et al. 2004. "Blue Silver: A Very Sensitive Colloidal Coomassie G-250 Staining for Proteome Analysis." *Electrophoresis* 25(9): 1327–33.
- Chan, Keith Syson et al. 2004. "Disruption of Stat3 Reveals a Critical Role in Both the Initiation and the Promotion Stages of Epithelial Carcinogenesis." *The Journal of clinical investigation* 114(5): 720–28.
- Checconi, Paola et al. 2015. "Redox Proteomics of the Inflammatory Secretome Identifies a Common Set of Redoxins and Other Glutathionylated Proteins Released in Inflammation, Influenza Virus Infection and Oxidative Stress." *PloS one* 10(5): e0127086.
- Chen, Mei-Ling et al. 2005. "Regulatory T Cells Suppress Tumor-Specific CD8 T Cell Cytotoxicity through TGF-Beta Signals in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(2): 419–24.
- Cho, Eunyoung, Hans-Olov Adami, and Per Lindblad. 2011. "Epidemiology of Renal Cell Cancer." *Hematology/oncology clinics of North America* 25(4): 651–65.
- Cho, In-Chang, and Jinsoo Chung. 2012. "Current Status of Targeted Therapy for Advanced Renal Cell Carcinoma." *Korean Journal of Urology* 53(4): 217.
- Chow, L Q, and S G Eckhardt. 2007. "Sunitinib: From Rational Design to Clinical Efficacy." *J Clin Oncol* 25(7): 884–96.

- Colin, Didier J, Karolina O Hain, Lindsey A Allan, and Paul R Clarke. 2015. "Cellular Responses to a Prolonged Delay in Mitosis Are Determined by a DNA Damage Response Controlled by Bcl-2 Family Proteins." *Open biology* 5(3): 140156.
- Conti, Alessandro et al. 2013. "Progress of Molecular Targeted Therapies for Advanced Renal Cell Carcinoma." *BioMed Research International* 2013.
- Crawford, Anatasha, and Rita Nahta. 2011. "Targeting Bcl-2 in Herceptin-Resistant Breast Cancer Cell Lines." *Current pharmacogenomics and personalized medicine* 9(3): 184–90.
- Croci, D. O. et al. 2012. "Disrupting Galectin-1 Interactions with N-Glycans Suppresses Hypoxia-Driven Angiogenesis and Tumorigenesis in Kaposi's Sarcoma." *Journal of Experimental Medicine* 209(11): 1985–2000.
- Cui, Ziwei et al. 2015. "Upregulation of Bcl-2 Enhances Secretion of Growth Factors by Adipose-Derived Stem Cells Deprived of Oxygen and Glucose." *Bioscience trends* 9(2): 122–28.
- Dar, Wasim A, and Stuart J Knechtle. 2007. "CXCR3-Mediated T-Cell Chemotaxis Involves ZAP-70 and Is Regulated by Signalling through the T-Cell Receptor." *Immunology* 120(4): 467–85.
- Demasi, Ana P D et al. 2007. "Expression of Peroxiredoxin I in Plasma Cells of Oral Inflammatory Diseases." *European journal of oral sciences* 115(4): 334–37.
- Ding, Qingqing et al. 2007. "Myeloid Cell Leukemia-1 Inversely Correlates with Glycogen Synthase Kinase-3beta Activity and Associates with Poor Prognosis in Human Breast Cancer." *Cancer research* 67(10): 4564–71.
- Dovrat, Shiri et al. 2014. "14-3-3 and β -Catenin Are Secreted on Extracellular Vesicles to Activate the Oncogenic Wnt Pathway." *Molecular oncology* 8(5): 894–911.
- Van Drie, John H. 2011. "Protein Folding, Protein Homeostasis, and Cancer." *Chinese journal of cancer* 30(2): 124–37.
- Elkholi, Rana, Thibaud T Renault, Madhavika N Serasinghe, and Jerry E Chipuk. 2014. "Putting the Pieces Together: How Is the Mitochondrial Pathway of Apoptosis Regulated in Cancer and Chemotherapy?" *Cancer & metabolism* 2: 16.
- van Engeland, M, F C Ramaekers, B Schutte, and C P Reutelingsperger. 1996. "A Novel Assay to Measure Loss of Plasma Membrane Asymmetry during Apoptosis of Adherent Cells in Culture." *Cytometry* 24(2): 131–39.
- Escudier, B et al. 1999. "Cytokines in Metastatic Renal Cell Carcinoma: Is It Useful to Switch to Interleukin-2 or Interferon after Failure of a First Treatment? Groupe Français d'Immunothérapie." *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 17(7): 2039–43.
- Escudier, B et al. 2012. "How to Select amongst Available Options for the Treatment of Advanced RCC?" *Ann Oncol* 23 Suppl 1: x309–12.
- Escudier, B. 2012. "Emerging Immunotherapies for Renal Cell Carcinoma." *Annals of Oncology* 23(SUPPL.8).

- Escudier, Bernard et al. 2007a. "Bevacizumab plus Interferon Alfa-2a for Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma: A Randomised, Double-Blind Phase III Trial." *Lancet* 370(9605): 2103–11.
- Escudier, Bernard et al. 2007b. "Bevacizumab plus Interferon Alfa-2a for Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma: A Randomised, Double-Blind Phase III Trial." *Lancet (London, England)* 370(9605): 2103–11.
- Fabian, M A et al. 2005. "A Small Molecule-Kinase Interaction Map for Clinical Kinase Inhibitors." *Nat Biotechnol* 23(3): 329–36.
- Fabian, Miles a et al. 2005. "A Small Molecule-Kinase Interaction Map for Clinical Kinase Inhibitors." *Nature biotechnology* 23(3): 329–36.
- Farmaki, E et al. 2011. "ERp29 Regulates Response to Doxorubicin by a PERK-Mediated Mechanism." *Biochimica et biophysica acta* 1813(6): 1165–71.
- Ferrara, Napoleone, Hans-Peter Gerber, and Jennifer LeCouter. 2003. "The Biology of VEGF and Its Receptors." *Nature medicine* 9(6): 669–76.
- Ferrari, D M, P Nguyen Van, H D Kratzin, and H D Soling. 1998. "ERp28, a Human Endoplasmic-Reticulum-Lumenal Protein, Is a Member of the Protein Disulfide Isomerase Family but Lacks a CXXC Thioredoxin-Box Motif." *Eur J Biochem* 255(3): 570–79.
- Finke, James et al. 2011. "MDSC as a Mechanism of Tumor Escape from Sunitinib Mediated Anti-Angiogenic Therapy." *International immunopharmacology* 11(7): 856–61.
- Fischer, Stefanie, Silke Gillessen, and Christian Rothermundt. 2015. "Sequence of Treatment in Locally Advanced and Metastatic Renal Cell Carcinoma." *Translational andrology and urology* 4(3): 310–25.
- Flanigan, Robert C et al. 2004. "Cytoreductive Nephrectomy in Patients with Metastatic Renal Cancer: A Combined Analysis." *The Journal of urology* 171(3): 1071–76.
- Flörcken, Anne et al. 2012. "Sorafenib, but Not Sunitinib, Induces Regulatory T Cells in the Peripheral Blood of Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma." *Anti-cancer drugs* 23(3): 298–302.
- Fodale, V, M Pierobon, L Liotta, and E Petricoin. 2011. "Mechanism of Cell Adaptation: When and How Do Cancer Cells Develop Chemoresistance?" *Cancer J* 17(2): 89–95.
- Framson, Paul E, and E Helene Sage. 2004. "SPARC and Tumor Growth: Where the Seed Meets the Soil?" *Journal of cellular biochemistry* 92(4): 679–90.
- Fukuda, Seiji, and Louis M Pelus. 2006. "Survivin, a Cancer Target with an Emerging Role in Normal Adult Tissues." *Molecular cancer therapeutics* 5(5): 1087–98.
- Furge, Kyle a., Jeffrey P. MacKeigan, and Bin T. Teh. 2010. "Kinase Targets in Renal-Cell Carcinomas: Reassessing the Old and Discovering the New." *The Lancet Oncology* 11(6): 571–78.
- Gardner, Brooke M et al. 2013. "Endoplasmic Reticulum Stress Sensing in the Unfolded Protein Response." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5(3): a013169.

- Gibney, G. T. et al. 2013. "C-Met Is a Prognostic Marker and Potential Therapeutic Target in Clear Cell Renal Cell Carcinoma." *Annals of Oncology* 24(2): 343–49.
- Gondi, C S et al. 2007. "Intraperitoneal Injection of a Hairpin RNA-Expressing Plasmid Targeting Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPA) Receptor and uPA Retards Angiogenesis and Inhibits Intracranial Tumor Growth in Nude Mice." *Clin Cancer Res* 13(14): 4051–60.
- Goplen, Dorota et al. 2006. "Protein Disulfide Isomerase Expression Is Related to the Invasive Properties of Malignant Glioma." *Cancer research* 66(20): 9895–9902.
- Gossage, Lucy, Tim Eisen, and Eamonn R Maher. 2015. "VHL, the Story of a Tumour Suppressor Gene." *Nature reviews. Cancer* 15(1): 55–64.
- Gottfried, E et al. 2006. "Tumor-Derived Lactic Acid Modulates Dendritic Cell Activation and Antigen Expression." *Blood* 107(5): 2013–21.
- Grunwald, V, and A S Merseburger. 2012. "Axitinib for the Treatment of Patients with Advanced Metastatic Renal Cell Carcinoma (mRCC) after Failure of Prior Systemic Treatment." *Onco Targets Ther* 5: 111–17.
- Grünwald, Viktor et al. 2011. "Efficacy of Sunitinib Re-Exposure after Failure of an mTOR Inhibitor in Patients with Metastatic RCC." *Onkologie* 34(6): 310–14.
- Gu, Y et al. 2010. "Sunitinib Impairs the Proliferation and Function of Human Peripheral T Cell and Prevents T-Cell-Mediated Immune Response in Mice." *Clin Immunol* 135(1): 55–62.
- Guérin, Renée, Geneviève Arseneault, Stéphane Dumont, and Luis A Rokeach. 2008. "Calnexin Is Involved in Apoptosis Induced by Endoplasmic Reticulum Stress in the Fission Yeast." *Molecular biology of the cell* 19(10): 4404–20.
- Hadrup, Sine, Marco Donia, and Per Thor Straten. 2013. "Effector CD4 and CD8 T Cells and Their Role in the Tumor Microenvironment." *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society* 6(2): 123–33.
- Harley, Margaret E, Lindsey A Allan, Helen S Sanderson, and Paul R Clarke. 2010. "Phosphorylation of Mcl-1 by CDK1-Cyclin B1 Initiates Its Cdc20-Dependent Destruction during Mitotic Arrest." *The EMBO journal* 29(14): 2407–20.
- He, Xuelian et al. 2013. "Suppression of Mitochondrial Complex I Influences Cell Metastatic Properties." *PloS one* 8(4): e61677.
- Vander Heiden, M G et al. 1997. "Bcl-xL Regulates the Membrane Potential and Volume Homeostasis of Mitochondria." *Cell* 91(5): 627–37.
- Hengartner, M O. 2000. "The Biochemistry of Apoptosis." *Nature* 407(6805): 770–76.
- Herman, J G et al. 1994. "Silencing of the VHL Tumor-Suppressor Gene by DNA Methylation in Renal Carcinoma." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(21): 9700–9704.
- Hetz, Claudio. 2012. "The Unfolded Protein Response: Controlling Cell Fate Decisions under ER Stress and Beyond." *Nature reviews. Molecular cell biology* 13(2): 89–102.

- Hillenkamp, F, and M Karas. 1990. "Mass Spectrometry of Peptides and Proteins by Matrix-Assisted Ultraviolet Laser Desorption/ionization." *Methods Enzymol* 193: 280–95.
- Hipp, M M et al. 2008. "Sorafenib, but Not Sunitinib, Affects Function of Dendritic Cells and Induction of Primary Immune Responses." *Blood* 111(12): 5610–20.
- Hombach, Andreas A, Markus Chmielewski, Gunter Rappl, and Hinrich Abken. 2013. "Adoptive Immunotherapy with Redirected T Cells Produces CCR7- Cells That Are Trapped in the Periphery and Benefit from Combined CD28-OX40 Costimulation." *Human gene therapy* 24(3): 259–69.
- Hoskin, D W et al. 2008. "Inhibition of T Cell and Natural Killer Cell Function by Adenosine and Its Contribution to Immune Evasion by Tumor Cells (Review)." *Int J Oncol* 32(3): 527–35.
- Hoskin, David W. et al. 2008. "Inhibition of T Cell and Natural Killer Cell Function by Adenosine and Its Contribution to Immune Evasion by Tumor Cells (Review)." *International Journal of Oncology* 32(3): 527–35.
- Huang, G, Y Chen, H Lu, and X Cao. 2007. "Coupling Mitochondrial Respiratory Chain to Cell Death: An Essential Role of Mitochondrial Complex I in the Interferon-Beta and Retinoic Acid-Induced Cancer Cell Death." *Cell death and differentiation* 14(2): 327–37.
- Hudes, Gary R. 2009. "Targeting mTOR in Renal Cell Carcinoma." *Cancer* 115(SUPPL. 10): 2313–20.
- Hu-Lowe, D D et al. 2008. "Nonclinical Antiangiogenesis and Antitumor Activities of Axitinib (AG-013736), an Oral, Potent, and Selective Inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinases 1, 2, 3." *Clin Cancer Res* 14(22): 7272–83.
- Hung, Y C et al. 2009. "Proteomic Screening of Antioxidant Effects Exhibited by Radix Salvia Miltiorrhiza Aqueous Extract in Cultured Rat Aortic Smooth Muscle Cells under Homocysteine Treatment." *J Ethnopharmacol* 124(3): 463–74.
- Iwamaru, A et al. 2007. "A Novel Inhibitor of the STAT3 Pathway Induces Apoptosis in Malignant Glioma Cells Both in Vitro and in Vivo." *Oncogene* 26(17): 2435–44.
- Jang, Ho Hee et al. 2004. "Two Enzymes in One; Two Yeast Peroxiredoxins Display Oxidative Stress-Dependent Switching from a Peroxidase to a Molecular Chaperone Function." *Cell* 117(5): 625–35.
- Jang, Miran, Sung Soo Kim, and Jinhwa Lee. 2013. "Cancer Cell Metabolism: Implications for Therapeutic Targets." *Experimental & molecular medicine* 45(10): e45.
- Keuling, Angela M et al. 2009. "RNA Silencing of Mcl-1 Enhances ABT-737-Mediated Apoptosis in Melanoma: Role for a Caspase-8-Dependent Pathway." *PloS one* 4(8): e6651.
- Khoo, Sok Kean et al. 2003. "Inactivation of BHD in Sporadic Renal Tumors Inactivation of BHD in Sporadic Renal Tumors 1." : 4583–87.
- Klose, J. 1975. "Protein Mapping by Combined Isoelectric Focusing and Electrophoresis of Mouse Tissues. A Novel Approach to Testing for Induced Point Mutations in Mammals." *Humangenetik* 26(3): 231–43.

- Kulbe, Hagen, Neil R Levinson, Fran Balkwill, and Julia L Wilson. 2004. "The Chemokine Network in Cancer--Much More than Directing Cell Movement." *The International journal of developmental biology* 48(5-6): 489-96.
- Laemmli, U K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-85.
- Larriba, José Luís González et al. 2012. "Sequential Therapy in Metastatic Renal Cell Carcinoma: Pre-Clinical and Clinical Rationale for Selecting a Second- or Subsequent-Line Therapy with a Different Mechanism of Action." *Cancer and Metastasis Reviews* 31: 1-7.
- Latif, F et al. 1993. "Identification of the von Hippel-Lindau Disease Tumor Suppressor Gene." *Science* 260(5112): 1317-20.
- Leich, F et al. 2007. "Endocytotic Internalization as a Crucial Factor for the Cytotoxicity of Ribonucleases." *J Biol Chem* 282(38): 27640-46.
- Levine, Beth, and Guido Kroemer. 2008. "Autophagy in the Pathogenesis of Disease." *Cell* 132(1): 27-42.
- Li, B. L. et al. 2009. "Characterization of HLA-G Expression in Renal Cell Carcinoma." *Tissue Antigens* 74(3): 213-21.
- Li, Qing-Chun et al. 2015. "Inhibition of γ -Secretase by Retinoic Acid Chalcone (RAC) Induces G2/M Arrest and Triggers Apoptosis in Renal Cell Carcinoma." *International journal of clinical and experimental pathology* 8(3): 2400-2407.
- Li, Zongwei, and Zhuoyu Li. 2012. "Glucose Regulated Protein 78: A Critical Link between Tumor Microenvironment and Cancer Hallmarks." *Biochimica et biophysica acta* 1826(1): 13-22.
- Lien, Y H, I Kam, P F Shanley, and G P Schroter. 1991. "Metastatic Renal Cell Carcinoma Associated with Acquired Cystic Kidney Disease 15 Years after Successful Renal Transplantation." *Am J Kidney Dis* 18(6): 711-15.
- Liepinsh, E et al. 2001. "Thioredoxin Fold as Homodimerization Module in the Putative Chaperone ERp29: NMR Structures of the Domains and Experimental Model of the 51 kDa Dimer." *Structure (London, England : 1993)* 9(6): 457-71.
- Linehan, W. Marston et al. 2004. "Genetic Basis of Cancer of the Kidney: Disease-Specific Approaches to Therapy." *Clinical Cancer Research* 10(18 II).
- Linge, Annett et al. 2012. "Differential Expression of Fourteen Proteins between Uveal Melanoma from Patients Who Subsequently Developed Distant Metastases versus Those Who Did Not." *Investigative ophthalmology & visual science* 53(8): 4634-43.
- Liu, Hong et al. 2014. "Modulation of BAG-1 Expression Alters the Sensitivity of Breast Cancer Cells to Tamoxifen." *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 33(2): 365-74.
- Liu, L et al. 2006. "Sorafenib Blocks the RAF/MEK/ERK Pathway, Inhibits Tumor Angiogenesis, and Induces Tumor Cell Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Model PLC/PRF/5." *Cancer Res* 66(24): 11851-58.

- Liu, Pixu, Hailing Cheng, Thomas M Roberts, and Jean J Zhao. 2009. "Targeting the Phosphoinositide 3-Kinase Pathway in Cancer." *Nature reviews. Drug discovery* 8(8): 627–44.
- Liu, W, S M Shen, X Y Zhao, and G Q Chen. 2012. "Targeted Genes and Interacting Proteins of Hypoxia Inducible Factor-1." *Int J Biochem Mol Biol* 3(2): 165–78.
- Ljungberg, Borje et al. 2015. "EAU Guidelines on Renal Cell Carcinoma: 2014 Update." *European urology* 67(5): 913–24.
- Ljungberg, Börje et al. 2010. "EAU Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2010 Update." *European urology* 58(3): 398–406.
- Lu, Weidong et al. 2014. "Peroxiredoxin 2 Is Upregulated in Colorectal Cancer and Contributes to Colorectal Cancer Cells' Survival by Protecting Cells from Oxidative Stress." *Molecular and cellular biochemistry* 387(1-2): 261–70.
- Luhn, S, M Berth, M Hecker, and J Bernhardt. 2003. "Using Standard Positions and Image Fusion to Create Proteome Maps from Collections of Two-Dimensional Gel Electrophoresis Images." *Proteomics* 3(7): 1117–27.
- Lyons, A B, and C R Parish. 1994. "Determination of Lymphocyte Division by Flow Cytometry." *J Immunol Methods* 171(1): 131–37.
- May, Dalit et al. 2005. "Ero1-L Alpha Plays a Key Role in a HIF-1-Mediated Pathway to Improve Disulfide Bond Formation and VEGF Secretion under Hypoxia: Implication for Cancer." *Oncogene* 24(6): 1011–20.
- McDermott, David F, and Michael B Atkins. 2008. "Immunotherapy of Metastatic Renal Cell Carcinoma." *Cancer journal (Sudbury, Mass.)* 14(5): 320–24.
- De Meester, I, S Korom, J Van Damme, and S Scharpé. 1999. "CD26, Let It Cut or Cut It Down." *Immunology today* 20(8): 367–75.
- Merlo, Lauren M F, and Carlo C Maley. 2010. "The Role of Genetic Diversity in Cancer." *The Journal of clinical investigation* 120(2): 401–3.
- Minárik, Ivo et al. 2013. "Regulatory T Cells, Dendritic Cells and Neutrophils in Patients with Renal Cell Carcinoma." *Immunology letters* 152(2): 144–50.
- Minkin, P et al. 2008. "Quantification of Sunitinib in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 874(1-2): 84–88.
- Mkrtchian, S et al. 2008. "ERp29, an Endoplasmic Reticulum Secretion Factor Is Involved in the Growth of Breast Tumor Xenografts." *Mol Carcinog* 47(11): 886–92.
- Mkrtchian, S, and T Sandalova. 2006. "ERp29, an Unusual Redox-Inactive Member of the Thioredoxin Family." *Antioxid Redox Signal* 8(3-4): 325–37.
- Mohan, Karkada et al. 2005. "CXCR3 Is Required for Migration to Dermal Inflammation by Normal and in Vivo Activated T Cells: Differential Requirements by CD4 and CD8 Memory Subsets." *European journal of immunology* 35(6): 1702–11.

- Mok, T S et al. 2009. "Gefitinib or Carboplatin-Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma." *N Engl J Med* 361(10): 947-57.
- Morelli, Maria Beatrice et al. 2015. "Axitinib Induces DNA Damage Response Leading to Senescence, Mitotic Catastrophe, and Increased NK Cell Recognition in Human Renal Carcinoma Cells." *Oncotarget* 6(34): 36245-59.
- Morgillo, Floriana et al. 2011. "Antitumor Activity of Sorafenib in Human Cancer Cell Lines with Acquired Resistance to EGFR and VEGFR Tyrosine Kinase Inhibitors." 6(12): 1-9.
- Motzer, R J et al. 2007. "Sunitinib versus Interferon Alfa in Metastatic Renal-Cell Carcinoma." *N Engl J Med* 356(2): 115-24.
- Motzer, R J, and P Russo. 2000. "Systemic Therapy for Renal Cell Carcinoma." *The Journal of urology* 163(2): 408-17.
- Murphy, Maureen E. 2013. "The HSP70 Family and Cancer." 00(00): 1-8.
- Nazarian, R et al. 2010. "Melanomas Acquire Resistance to B-RAF(V600E) Inhibition by RTK or N-RAS Upregulation." *Nature* 468(7326): 973-77.
- Neuhoff, V, N Arold, D Taube, and W Ehrhardt. 1988. "Improved Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels Including Isoelectric Focusing Gels with Clear Background at Nanogram Sensitivity Using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250." *Electrophoresis* 9(6): 255-62.
- Nonn, Larisa, Margareta Berggren, and Garth Powis. 2003. "Increased Expression of Mitochondrial Peroxiredoxin-3 (thioredoxin Peroxidase-2) Protects Cancer Cells against Hypoxia and Drug-Induced Hydrogen Peroxide-Dependent Apoptosis." *Molecular cancer research : MCR* 1(9): 682-89.
- O'Hare, T, C A Eide, and M W Deininger. 2007. "Bcr-Abl Kinase Domain Mutations, Drug Resistance, and the Road to a Cure for Chronic Myeloid Leukemia." *Blood* 110(7): 2242-49.
- Oosterwijk, Egbert et al. 2008. "Antibody Therapy in Renal Cell Carcinoma." *World Journal of Urology* 26(2): 141-46.
- Park, So Yeon et al. 2010. "Cellular and Genetic Diversity in the Progression of in Situ Human Breast Carcinomas to an Invasive Phenotype." *The Journal of clinical investigation* 120(2): 636-44.
- Parry, L et al. 2001. "Analysis of the TSC1 and TSC2 Genes in Sporadic Renal Cell Carcinomas." *British journal of cancer* 85(8): 1226-30.
- Pattingre, S et al. 2005. "Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy." *Cell* 122(6): 927-39.
- Penticuff, Justin C, and Natasha Kyprianou. 2015. "Therapeutic Challenges in Renal Cell Carcinoma." *American journal of clinical and experimental urology* 3(2): 77-90.
- Peterson, J R, A Ora, P N Van, and A Helenius. 1995. "Transient, Lectin-like Association of Calreticulin with Folding Intermediates of Cellular and Viral Glycoproteins." *Molecular biology of the cell* 6(9): 1173-84.

- Phalen, Timothy J et al. 2006. "Oxidation State Governs Structural Transitions in Peroxiredoxin II That Correlate with Cell Cycle Arrest and Recovery." *The Journal of cell biology* 175(5): 779–89.
- Pinthus, Jehonathan H. et al. 2011. "Metabolic Features of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma: Mechanisms and Clinical Implications." *Journal of the Canadian Urological Association* 5(4): 274–82.
- Polivka, Jiri, and Filip Janku. 2014. "Molecular Targets for Cancer Therapy in the PI3K/AKT/mTOR Pathway." *Pharmacology & therapeutics* 142(2): 164–75.
- Poole, Leslie B, Andrea Hall, and Kimberly J Nelson. 2011. "Overview of Peroxiredoxins in Oxidant Defense and Redox Regulation." *Current protocols in toxicology / editorial board, Mahin D. Maines (editor-in-chief) ... [et al.] Chapter 7: Unit7.9.*
- Poole, Leslie B, and Kimberly J Nelson. 2008. "Discovering Mechanisms of Signaling-Mediated Cysteine Oxidation." *Current opinion in chemical biology* 12(1): 18–24.
- Porta, Camillo et al. 2011. "Sequential Use of Sorafenib and Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma (RCC): An Italian Multicentre Retrospective Analysis of 189 Patient Cases." *BJU International* 108(8 B): 250–57.
- Posadas, Edwin M, and Robert A Figlin. 2012. "Systemic Therapy in Renal Cell Carcinoma: Advancing Paradigms." *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 26(3): 290–301.
- Rahmani, Mohamed et al. 2007. "The Kinase Inhibitor Sorafenib Induces Cell Death through a Process Involving Induction of Endoplasmic Reticulum Stress." *Molecular and cellular biology* 27(15): 5499–5513.
- Rini, B I, and M B Atkins. 2009. "Resistance to Targeted Therapy in Renal-Cell Carcinoma." *Lancet Oncol* 10(10): 992–1000.
- Rini, B I, S C Campbell, and B Escudier. 2009. "Renal Cell Carcinoma." *Lancet* 373(9669): 1119–32.
- Rini, Brian I et al. 2011. "Comparative Effectiveness of Axitinib versus Sorafenib in Advanced Renal Cell Carcinoma (AXIS): A Randomised Phase 3 Trial." *Lancet (London, England)* 378(9807): 1931–39.
- Rini, Brian I, and Michael B. Atkins. 2009. "Resistance to Targeted Therapy in Renal-Cell Carcinoma." *The Lancet Oncology* 10(10): 992–1000.
- Rini, Brian I, Steven C. Campbell, and Bernard Escudier. 2009. "Renal Cell Carcinoma." *The Lancet* 373(9669): 1119–32.
- Ron, David, and Peter Walter. 2007. "Signal Integration in the Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response." *Nature reviews. Molecular cell biology* 8(7): 519–29.
- Rubin, B P, and A Duensing. 2006. "Mechanisms of Resistance to Small Molecule Kinase Inhibition in the Treatment of Solid Tumors." *Lab Invest* 86(10): 981–86.
- Rugo, H S et al. 2005. "Phase I Trial of the Oral Antiangiogenesis Agent AG-013736 in Patients with Advanced Solid Tumors: Pharmacokinetic and Clinical Results." *J Clin Oncol* 23(24): 5474–83.

- Ruiz, C et al. 2011. "Advancing a Clinically Relevant Perspective of the Clonal Nature of Cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(29): 12054–59.
- Said, Neveen et al. 2013. "Loss of SPARC in Bladder Cancer Enhances Carcinogenesis and Progression." *Journal of Clinical Investigation* 123(2): 751–66.
- Sailaja, G S et al. 2013. "The Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) Induces Endoplasmic Reticulum Stress Leading to Autophagy-Mediated Apoptosis in Neuroblastoma." *International journal of oncology* 42(1): 188–96.
- Samraj, Ajoy K, Dennis Sohn, Klaus Schulze-Osthoff, and Ingo Schmitz. 2007. "Loss of Caspase-9 Reveals Its Essential Role for Caspase-2 Activation and Mitochondrial Membrane Depolarization." *Molecular biology of the cell* 18(1): 84–93.
- Samstag, Yvonne, Isabel John, and Guido H Wabnitz. 2013. "Cofilin: A Redox Sensitive Mediator of Actin Dynamics during T-Cell Activation and Migration." *Immunological reviews* 256(1): 30–47.
- Santoni, Matteo et al. 2014. "Role of Natural and Adaptive Immunity in Renal Cell Carcinoma Response to VEGFR-TKIs and mTOR Inhibitor." *International Journal of Cancer* 134(12): 2772–77.
- Saraste, M. 1999. "Oxidative Phosphorylation at the Fin de Siècle." *Science* 283(5407): 1488–93.
- Sato, Tsutomu et al. 2013. "Clinical Significance of SPARC Gene Expression in Patients with Gastric Cancer." *Journal of surgical oncology* 108(6): 364–68.
- Schutz, Fabio a B, Toni K. Choueiri, and Cora N. Sternberg. 2011. "Pazopanib: Clinical Development of a Potent Anti-Angiogenic Drug." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 77(3): 163–71.
- Scudiero, D A et al. 1988. "Evaluation of a Soluble Tetrazolium/formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines." *Cancer research* 48(17): 4827–33.
- Seliger, B et al. 2007. "Ubiquitin COOH-Terminal Hydrolase 1: A Biomarker of Renal Cell Carcinoma Associated with Enhanced Tumor Cell Proliferation and Migration." *Clin Cancer Res* 13(1): 27–37.
- Seliger, B et al. 2010. "Antitumour and Immune-Adjuvant Activities of Protein-Tyrosine Kinase Inhibitors." *Trends Mol Med* 16(4): 184–92.
- Seliger, Barbara et al. 2011. "Linkage of microRNA and Proteome-Based Profiling Data Sets: A Perspective for the Priorization of Candidate Biomarkers in Renal Cell Carcinoma?" *Journal of Proteome Research* 10(1): 191–99.
- Shah, N P et al. 2002. "Multiple BCR-ABL Kinase Domain Mutations Confer Polyclonal Resistance to the Tyrosine Kinase Inhibitor Imatinib (STI571) in Chronic Phase and Blast Crisis Chronic Myeloid Leukemia." *Cancer Cell* 2(2): 117–25.
- Sharma, S et al. 2010. "A Phase I Study of Axitinib (AG-013736) in Combination with Bevacizumab plus Chemotherapy or Chemotherapy Alone in Patients with Metastatic Colorectal Cancer and Other Solid Tumors." *Ann Oncol* 21(2): 297–304.

- Sherr, Charles J. 2004. "Principles of Tumor Suppression." *Cell* 116(2): 235–46.
- Shnyder, S D, J E Mangum, and M J Hubbard. 2008. "Triplex Profiling of Functionally Distinct Chaperones (ERp29/PDI/BiP) Reveals Marked Heterogeneity of the Endoplasmic Reticulum Proteome in Cancer." *J Proteome Res* 7(8): 3364–72.
- Shojaei, Farbod et al. 2007. "Tumor Refractoriness to Anti-VEGF Treatment Is Mediated by CD11b+Gr1+ Myeloid Cells." *Nature biotechnology* 25(8): 911–20.
- Siddiqui, Waseem Ahmad, Amjid Ahad, and Haseeb Ahsan. 2015. "The Mystery of BCL2 Family: Bcl-2 Proteins and Apoptosis: An Update." *Archives of Toxicology* 89(3): 289–317.
- Singhal, Sharad S. et al. 2010. "Rlip76 Transports Sunitinib and Sorafenib and Mediates Drug Resistance in Kidney Cancer." *International Journal of Cancer* 126(6): 1327–38.
- Sohn, Dennis, Klaus Schulze-Osthoff, and Reiner U. Jänicke. 2005. "Caspase-8 Can Be Activated by Interchain Proteolysis without Receptor-Triggered Dimerization during Drug-Induced Apoptosis." *Journal of Biological Chemistry* 280(7): 5267–73.
- Song, Lanxi et al. 2005. "Mcl-1 Regulates Survival and Sensitivity to Diverse Apoptotic Stimuli in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells." *Cancer biology & therapy* 4(3): 267–76.
- Stehle, Franziska et al. 2013. "Reduced Immunosuppressive Properties of Axitinib in Comparison with Other Tyrosine Kinase Inhibitors." *Journal of Biological Chemistry* 288(23): 16334–47.
- Sternberg, Cora N et al. 2010. "Pazopanib in Locally Advanced or Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase III Trial." *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28(6): 1061–68.
- Sternberg, Cora N et al. 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 (Oxford, England : 1990)* 49(6): 1287–96.
- Strumberg, D et al. 2005. "Phase I Clinical and Pharmacokinetic Study of the Novel Raf Kinase and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Inhibitor BAY 43-9006 in Patients with Advanced Refractory Solid Tumors." *J Clin Oncol* 23(5): 965–72.
- Su, Jing et al. 2014. "Bcl-2 Family Proteins Are Involved in the Signal Crosstalk between Endoplasmic Reticulum Stress and Mitochondrial Dysfunction in Tumor Chemotherapy Resistance." *BioMed research international* 2014: 234370.
- Sudarshan, Sunil et al. 2011. "Reduced Expression of Fumarate Hydratase in Clear Cell Renal Cancer Mediates HIF-2?? Accumulation and Promotes Migration and Invasion." *PLoS ONE* 6(6).
- Suhane, Sonal, Dror Berel, and V Krishnan Ramanujan. 2011. "Biomarker Signatures of Mitochondrial NDUF53 in Invasive Breast Carcinoma." *Biochemical and biophysical research communications* 412(4): 590–95.
- Sun, Qi-An, and Vadim N Gladyshev. 2002. "Redox Regulation of Cell Signaling by Thioredoxin Reductases." *Protein Sensors and Reactive Oxygen Species - Part A: Selenoproteins and Thioredoxin* 347(35): 451–61.

- Takahashi, Atsushi, Hiroki Sasaki, and Sun Jin Kim. 1994. "Markedly Increased Amounts of Messenger RNAs for Vascular Endothelial Growth Factor and Placenta Growth Factor in Renal Cell Carcinoma Associated with Angiogenesis Markedly Increased Amounts of Messenger RNAs for Vascular Endothelial Growth Factor and Pla." : 4233–37.
- Tanaka, S, T Uehara, and Y Nomura. 2000. "Up-Regulation of Protein-Disulfide Isomerase in Response to Hypoxia/brain Ischemia and Its Protective Effect against Apoptotic Cell Death." *The Journal of biological chemistry* 275(14): 10388–93.
- Terrano, David T, Meenakshi Upreti, and Timothy C Chambers. 2010. "Cyclin-Dependent Kinase 1-Mediated Bcl-xL/Bcl-2 Phosphorylation Acts as a Functional Link Coupling Mitotic Arrest and Apoptosis." *Molecular and cellular biology* 30(3): 640–56.
- Towbin, H, T Staehelin, and J Gordon. 1979. "Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(9): 4350–54.
- Trunzer, Kerstin et al. 2013. "Pharmacodynamic Effects and Mechanisms of Resistance to Vemurafenib in Patients with Metastatic Melanoma." *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31(14): 1767–74.
- Tsuzuki, Toyonori et al. 2014. "Tyrosine Kinase Inhibitor-Induced Vasculopathy in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: An Unrecognized Antitumour Mechanism." *Histopathology* 64(4): 484–93.
- Tzivion, Guri, Vinita Singh Gupta, Ludmila Kaplun, and Vitaly Balan. 2006. "14-3-3 Proteins as Potential Oncogenes." *Seminars in cancer biology* 16(3): 203–13.
- Unlu, M, M E Morgan, and J S Minden. 1997. "Difference Gel Electrophoresis: A Single Gel Method for Detecting Changes in Protein Extracts." *Electrophoresis* 18(11): 2071–77.
- Uyttenhove, Catherine et al. 2003. "Evidence for a Tumoral Immune Resistance Mechanism Based on Tryptophan Degradation by Indoleamine 2,3-Dioxygenase." *Nature medicine* 9(10): 1269–74.
- Vazquez-Martin, A et al. 2009. "mTOR Inhibitors and the Anti-Diabetic Biguanide Metformin: New Insights into the Molecular Management of Breast Cancer Resistance to the HER2 Tyrosine Kinase Inhibitor Lapatinib (Tykerb)." *Clin Transl Oncol* 11(7): 455–59.
- Wake, Matthew S, and Christine J Watson. 2015. "STAT3 the Oncogene - Still Eluding Therapy?" *FEBS Journal*: n/a – n/a. <http://doi.wiley.com/10.1111/febs.13285>.
- Warburg, O, K Posener, and E Negelein. 1924. "Über Den Stoffwechsel Der Carcinomcelle." *Biochem* 152: 309–44.
- Warrick, Joshua I et al. 2014. "Papillary Renal Cell Carcinoma Revisited: A Comprehensive Histomorphologic Study with Outcome Correlations." *Human pathology* 45(6): 1139–46.
- Wei, Yongjie et al. 2013. "EGFR-Mediated Beclin 1 Phosphorylation in Autophagy Suppression, Tumor Progression, and Tumor Chemoresistance." *Cell* 154(6): 1269–84.
- Welti, J C et al. 2011. "Fibroblast Growth Factor 2 Regulates Endothelial Cell Sensitivity to Sunitinib." *Oncogene* 30(10): 1183–93.

- Whiteside, T L. 2008. "The Tumor Microenvironment and Its Role in Promoting Tumor Growth." *Oncogene* 27(45): 5904–12.
- Whiteside, Theresa L. 2006. "Immune Suppression in Cancer: Effects on Immune Cells, Mechanisms and Future Therapeutic Intervention." *Seminars in Cancer Biology* 16(1): 3–15.
- Whiteside, Tl. 2008. "The Tumor Microenvironment and Its Role in Promoting Tumor Growth." *Oncogene* 27(45): 5904–12.
- Wilhelm, S M et al. 2004. "BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity and Targets the RAF/MEK/ERK Pathway and Receptor Tyrosine Kinases Involved in Tumor Progression and Angiogenesis." *Cancer Res* 64(19): 7099–7109.
- Wilhelm, Scott et al. 2006. "Discovery and Development of Sorafenib: A Multikinase Inhibitor for Treating Cancer." *Nature reviews. Drug discovery* 5(10): 835–44.
- Williams, Michelle M, and Rebecca S Cook. 2015. "Bcl-2 Family Proteins in Breast Development and Cancer : Could Mcl-1 Targeting Overcome Therapeutic Resistance ?" 6(6).
- Wong, Ping-Pui et al. 2015. "Dual-Action Combination Therapy Enhances Angiogenesis While Reducing Tumor Growth and Spread." *Cancer cell* 27(1): 123–37.
- Yang, James C et al. 2003. "Randomized Study of High-Dose and Low-Dose Interleukin-2 in Patients with Metastatic Renal Cancer." *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21(16): 3127–32.
- You, Liangkun et al. 2015. "The Role of STAT3 in Autophagy." *Autophagy*.
- Youn, H. 1999. "Apoptosis of T Cells Mediated by Ca²⁺-Induced Release of the Transcription Factor MEF2." *Science* 286(5440): 790–93.
- Yu, Chunrong et al. 2005. "The Role of Mcl-1 Downregulation in the Proapoptotic Activity of the Multikinase Inhibitor BAY 43-9006." *Oncogene* 24(46): 6861–69.
- Yu, Li, Xun Chen, Liantang Wang, and Shangwu Chen. 2016. "The Sweet Trap in Tumors: Aerobic Glycolysis and Potential Targets for Therapy." *Oncotarget* 5.
- Zhang, B et al. 2008. "ERp29 Is a Radiation-Responsive Gene in IEC-6 Cell." *J Radiat Res* 49(6): 587–96.
- Zhang, Daohai, and Des R. Richardson. 2011. "Endoplasmic Reticulum Protein 29 (ERp29): An Emerging Role in Cancer." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 43(1): 33–
- Zhi, Wanqing Iris, and Jenny J Kim. 2014. "An Update on Current Management of Advanced Renal Cell Cancer, Biomarkers, and Future Directions." *Annals of cancer research* 1(2): 1–10.
- Zhou, Hui et al. 2011. "Novel Mechanism of Anti-Apoptotic Function of 78-kDa Glucose-Regulated Protein (GRP78): Endocrine Resistance Factor in Breast Cancer, through Release of B-Cell Lymphoma 2 (BCL-2) from BCL-2-Interacting Killer (BIK)." *The Journal of biological chemistry* 286(29): 25687–96.
- Zhou, Xiaohua et al. 2009. "Gefitinib Inhibits the Proliferation of Pancreatic Cancer Cells via Cell Cycle Arrest." *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)* 292(8): 1122–27.

Znaor, Ariana et al. 2015. "International Variations and Trends in Renal Cell Carcinoma Incidence and Mortality." *European urology* 67(3): 519–30.

Curriculum Vitae

Persönliche Informationen

Vorname, Nachname	Kristin Schulz
Adresse	Wolfsburger Straße 28 06126 Halle, Deutschland
Telefon (mobil)	+49 (0) 1782071117
E-Mail	Kristin.schulz1984@gmail.com
Nationalität	Deutsch
Geburtsdatum/Ort	06.07.1984, Räckelwitz

Berufliche Tätigkeiten

Gegenwärtig	Sales Representative bei NH DyeAGNOSTICS GmbH
Dezember 2010 - April 2015	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Medizinische Immunologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Anfertigung der Doktorarbeit, Assistenz in Lehre und Betreuung von BA-Studenten
Januar 2010 - November 2010	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie und Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Expression und Reinigung der SUMO-fusionierten Kinase-homologie-Domäne der humanen ROS-GC
April 2009 - Dezember 2009	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Expression und Reinigung des Proteins TatA aus <i>E.coli</i>
Dezember 2008 - März 2009	Hilfswissenschaftlerin am Institut für Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Expression und Reinigung des Membranproteins FocA aus <i>E. Coli</i>

Qualifizierungsphasen, Studium und Schule

Dezember 2010 - April 2015

Promovendin zum Thema " Einfluss von Tyrosinkinaseinhibitoren auf das humane Nierenzellkarzinom und Immunzellen"

November 2008

Erlangung des akademischen Grades Diplom-Biochemikerin

Angefertigt am Institut für Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Thema: „Anreicherung und Charakterisierung der 2-Hydroxyisobutyryl-CoA Ligase im aeroben Abbauweg von Methyl-tertiär-butylether“

Oktober 2003 - November 2008

Diplom-Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

August 1995 - Juni 2003

Abitur am Gotthold-Ephraim-Lessing-Gymnasium, Kamenz

Publikationsliste

Falke, Dörte et al. 2010. "Unexpected Oligomeric Structure of the FocA Formate Channel of Escherichia Coli : A Paradigm for the Formate-Nitrite Transporter Family of Integral Membrane Proteins." FEMS microbiology letters 303(1): 69–75.

Stehle, Franziska et al. 2013. "Reduced Immunosuppressive Properties of Axitinib in Comparison with Other Tyrosine Kinase Inhibitors." Journal of Biological Chemistry 288(23): 16334–47.

Jasinski-Bergner, Simon et al. 2014. "Identification of 14-3-3 β Gene as a Novel miR-152 Target Using a Proteome-Based Approach." The Journal of biological chemistry 289(45): 31121–35.

Stehle, Franziska, Kristin Schulz, and Barbara Seliger. 2014. "Towards Defining Biomarkers Indicating Resistances to Targeted Therapies." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics 1844(5): 909–16.

Leisz, Sandra et al. 2015. "Distinct von Hippel-Lindau Gene and Hypoxia-Regulated Alterations in Gene and Protein Expression Patterns of Renal Cell Carcinoma and Their Effects on Metabolism." Oncotarget 6(13): 11395–406.

Stehle, Franziska et al. 2015. "VHL-Dependent Alterations in the Secretome of Renal Cell Carcinoma: Association with Immune Cell Response?" Oncotarget 6(41): 43420–37.

Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. Ulrich Arnold sehr für die Übernahme des Erstgutachtens. Da ich nicht in einem naturwissenschaftlichen Thema promovieren wollte, bin ich ihm sehr dankbar, dass er die Herausforderung angenommen hat und meine Arbeit betreut hat. Die Gespräche mit ihm haben es mir ermöglicht meine Daten objektiv zu bewerten und in der Vielzahl dieser einen roten Faden zu finden.

Frau Prof. Dr. Seliger danke ich für die Bereitstellung des Themas. Ich habe an ihrem Institut viele neue Techniken erlernen dürfen. Obwohl ich vorher nicht auf medizinischem Gebiet gearbeitet habe, gab sie mir die Chance in diesem wichtigen und interessanten Themengebiet arbeiten zu können. Ich danke ihr zudem für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Clemen danke recht herzlich für die freundliche Bereitschaft die externe Begutachtung meiner Arbeit zu übernehmen.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meiner Betreuerin und Freundin Dr. Franziska Stehle. Sie übernahm vom ersten Tag an meine Ausbildung in der medizinischen Immunologie und half mir, die für mich neuen Techniken schnell zu erlernen und mich in die Materie einzuarbeiten. Unzählige Stunden in der Zellkultur oder in der Masse sowie unsere langen Gespräche und Diskussionen haben uns über die Jahre eng zusammengeschweißt. Dank ihr habe ich den Mut gefasst, diese Arbeit anzufertigen. Nicht nur im Institut sondern auch privat haben wir viele lustige und bewegende Momente geteilt. Dank ihr werde ich diesen Lebensabschnitt in guter Erinnerung behalten, auch wenn es nicht immer einfach war.

Auch den übrigen Mitarbeitern des Instituts möchte ich für die gute und kollegiale Zusammenarbeit danken. Rudolf Lichtenfels hat mir die Schönheit der 2D-Gelelektrophorese gezeigt. Seine fachlichen und handwerklichen Fähigkeiten und seine Witze haben das Laborleben sehr bereichert. Simon, Anja, Andre, Claudia, Jette, Jürgen, Nicole und Sylvi möchte ich für die Gespräche danken. Wenn ich einmal nicht weiter wusste, haben sie mir jeder auf ihrem ganz eigenen Gebiet immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden, vielen Dank.

Ein besonderer Dank gilt Jana Kalich. Ihre Unterstützung und ihr liebes Wesen haben meinen Laboralltag sehr bereichert. Ohne Sie wäre ich in der Zellkultur oder beim Pipettieren der ungezählten qPCRs oder Spotaufarbeitungen oft verzweifelt. Ihr Knowhow am Durchflusszytometer hat viele der in diese Arbeit eingeflossenen Ergebnisse ermöglicht.

Ganz besonders möchte ich meinen Freunden danken. Einige waren auch Kollegen, viele Studienfreunde und auch Begleiter auf nicht wissenschaftlichen Wegen. Die Jahre meiner Promotion waren weder wissenschaftlich noch privat immer einfach. Es gab viele Hochs und Tiefs und sie haben alles mit mir durchgestanden. Ohne sie hätte ich weder Studium noch Promotion fertig gebracht. Ich danke euch von ganzem Herzen. Ihr seid meine Familie hier in Halle.

Ein großes Dankeschön gilt natürlich meiner Familie. Sie haben mich auf meinem Weg stets begleitet und unterstützt. Auch wenn sie vielleicht nicht immer verstanden haben, über was ich eigentlich rede, haben sie immer Interesse gezeigt und mich nach allen Kräften unterstützt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der aufgeführten Literatur und der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben und die den benutzen Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht zu haben.

Diese Arbeit wurde keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung vorgelegt.

Halle, den 30.05.2016

.....

Kristin Schulz