

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

Bedeutung von Integrin- α 5 und seiner Signalwege für die Tumorprogression beim
klarzelligen Nierenzellkarzinom

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

Vorgelegt von

Franz Proisinger
aus Wolfkratshausen

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

12. Juli 2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
1. Einleitung.....	1
2. Literaturdiskussion	2
2.1 Nierenzellkarzinom	2
2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	2
2.1.2 Histologische Typen und deren Einteilung.....	5
2.1.3 Symptome	8
2.1.4 Diagnostik des Nierenzellkarzinoms und TNM-Klassifikation	9
2.1.5 Therapie und Prognose	11
2.1.6 Metastasierung des Nierenzellkarzinoms	16
2.2 Metastasierung	16
2.2.1 Allgemeine Metastasierungsprozesse	17
2.3 Integrine.....	20
2.3.1 Aufbau und Strukturänderungen.....	20
2.3.2 Integrin-Signalkaskaden und deren physiologischen Folgen	23
2.4 Bedeutung des Integrins- α 5 für die Tumorprogression.....	24
3. Material und Methoden.....	27
3.1 Materialien	27
3.1.1 Kontinuierliche Zelllinien	27
3.1.2 Gebrauchsgegenstände	28
3.1.3 Verbrauchsgegenstände.....	28
3.1.4 Substanzen.....	28
3.1.5 Puffer und Lösungen	30
3.1.6 Kits.....	31
3.1.7 Antikörper	31
3.1.8 Größen- und Molekularstandards.....	32

3.1.9	Geräte	32
3.2	Methoden	33
3.2.1	Zellkulturarbeiten.....	33
3.2.2	Zellzählung in Neubauerkammer	36
3.2.3	FACS	36
3.2.4	Migrationsversuch in Boydenkammer	37
3.2.5	Zelladhäsionsversuch	39
3.2.6	Immunzytochemie	41
3.2.7	Westernblot	42
3.2.8	GloMax Proliferations- und Zytotoxizitätssessay.....	47
4.	Ergebnisse.....	50
4.1	Expressionslevel von Integrin- α 5 in verschiedenen NZK-Zelllinien	50
4.2	Einfluss von Integrin- α 5 auf die Migration	51
4.3	Einfluss von Integrin- α 5 auf die zelluläre Adhäsion.....	55
4.4	Immunzytochemischer Nachweis von Integrin- α 5	60
4.5	Einfluss von Integrin- α 5 auf die Signalkaskaden in Nierenkarzinomzellen.....	62
4.5.1	Einfluss auf Paxillin	62
4.5.2	Einfluss auf FAK.....	64
4.5.3	Einfluss auf SRC	66
4.5.4	Einfluss auf SHC	68
4.4.5	Einfluss auf AKT.....	70
4.4.6	Einfluss auf ERK.....	72
4.6	Einfluss von Integrin- α 5 auf die Zellvitalität	74
5.	Diskussion	80
5.1	Integrin- α 5 β 1-Expression bei klarzelligen Nierenkarzinomzelllinien.....	80
5.2	Beteiligung von Integrin- α 5 β 1 bei den metastatischen Prozessen Invasion, Intravasation und Extravasation	80
5.3	Adhäsion und Migration beruhen auf der Beteiligung der AKT- und ERK- Signalkaskaden	83

5.4 Beteiligung von ERK 1/2 und AKT auf das Zellüberleben und die Proliferation von Nierenkarzinomzellen.....	85
5.5 Volociximab als neue Therapiestrategie des Nierenzellkarzinoms	87
6. Zusammenfassung	89
7. Literaturverzeichnis	91
8. Anhang	110
8.1. FACS	110
8.2 Migration	112
8.3 Adhäsion.....	113
8.4 Westernblot.....	117
8.5 Zellvitalität.....	124
9. Danksagung	127
10. Tabellarischer Lebenslauf	128

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABI 1	Abl interactor 1/Abelson interactor 1
AKR1B10	Aldo-keto reductase family 1 member B10
AKT	AKT8 virus oncogene cellular homolog
AMACR	Alpha-Methylacyl-CoA Racemase
APS	Ammonium Persulfate
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bichinoninsäure
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL-X _L	B-cell lymphoma-extra large
BIM	Bcl-2-like protein 11
BSA	Bovine serum albumin
CA IX	Karboanhydrase 9
ccRCC	klarzelliges Nierenzellkarzinom
CD 10	Cluster of differentiation 10
CDK2	Cycklin dependent kinase 2
CDKN2	Cyclin dependent kinase inhibitor 2
CEA	Carcino-embryonic antigen
CEPC	circulating endothelial progenitor cell
c-Fos	cellular Fos
chRCC	Chromophobes Nierenzellkarzinom
CK 7	Zytokeratin 7
CKI	Cyklin dependent kinase inhibitor

Abkürzungsverzeichnis

c-jun	cellular jun
c-myc	Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPS II	Carbamoylphosphate synthetase II
CSC	Cancer Stem Cell
CT	Computertomographie
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
DAB	Diaminobenzidin
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxide
DOCK	Dedicator of cytokinesis
(D)PBS	(Dulbecco's) phosphate buffered saline
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent assay
ELK-1	ETS transcription factor ELK1
EMT	Epitheliale mesenchymale Transformation
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAK	Focal adhesion kinase
FAS (Ligand)	TNF superfamily receptor 6 (Ligand)
FB	Fibrinogen

Abkürzungsverzeichnis

FCS	Fetal calf serum
FKHR	Forkhead in rhabdomyosarcoma
FN	Fibronektin
GEF-H1	Guanine exchange factor H1
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 β
HIF- α	Hypoxia inducing factor α
HM	serumfreies Medium
ILK	Integrin-linked kinase
IMDC	International metastatic RCC database consortium
ISUP	International Society of Urological Pathology
KIT	KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
KLK7	Kallikrein-related peptidase 7
LOXL-2	Lysyl oxidase homolog 2
MET	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
min	Minuten
MMP	Matrix metalloproteinase
mRCC	Metastasiertes Nierenzellkarzinom
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
NaOH	Natriumhydroxid
NEU1	Sialidase 1
NRF2	Nuclear factor erythroid-2-related factor 2
NSCLC	Non-small cell lung cancer
NZK	Nierenzellkarzinom

Abkürzungsverzeichnis

P27 ^{Kib1}	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
P90 RSK	90kD Ribosomale Protein S6 Kinase
P130CAS	p130 Crk-associated substrate
PD1	Programmed cell death protein 1
PD1-1L	Programmed cell death 1 ligand 1
PI3K	Phosphoinositid-3-kinase
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate
pRCC	Papilläres Nierenzellkarzinom
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTH	Parathormon
PVDF	Polyvinylidenedifluoride
RAC	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RAS	Rat sarcoma
RC-1	CCF-RC1
RCC	Nierenzellkarzinom
RGD-Sequenz	Arginin-Glycin-Asparagin-Sequenz
RHOA	Ras homolog family member A
RKI	Robert-Koch-Institut
ROCK	Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase
RSK	Ribosomal protein S6 kinase
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
SCR	Short consensus repeats
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis
SETD2	SET domain containing 2

Abkürzungsverzeichnis

SHC	SH2-containing collagen-related proteins
SRC	Rous sarcoma oncogene cellular homolog
SSIGN-Score	Mayo Clinic stage, size, grade and necrosis score
Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline with Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TP53	Tumor protein p53
U/min	Umdrehungen pro Minute
UCLA-ISS	University of California integrated staging system
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
VHL	Von Hippel Lindau
WAVE2	Wiskott Aldrich Syndrom Protein 2
WHO	World Health Organization
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
ZKD	Zentrum für Krebsregisterdaten

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberate beim Nierenzellkarzinom im internationalen Vergleich nach Geschlecht, 2017-2018 oder letztes verfügbare Jahr je 100.000	2
Abb. 2 Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen aller Tumorneuerkrankungen in Deutschland 2018 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs)	3
Abb. 3 Molekulare Zielstrukturen im VHL Signalweg des klarzelligen Nierenzellkarzinoms	4
Abb. 4 Morphologie der drei Major-Subtypen des Nierenzellkarzinoms in Hämatoxylin-Eosin Färbung	7
Abb. 5 Therapieschema des metastasierten Nierenzellkarzinoms	14
Abb. 6 Die Integrinsuperfamilie.....	21
Abb. 7 Graphische Übersicht der wichtigsten Signalwege von Integrinen und ihr Einfluss auf das Zellverhalten.....	24
Abb. 8 Schematische Darstellung des Aufbaus einer modifizierten Boydenkammer für den Migrationsversuch.....	39
Abb. 9 Schematische Darstellung der Blotting-Apparatur.....	46
Abb. 10 Schematische Darstellung des CellTiter-Glo® Versuchs	48
Abb. 11 Schematische Darstellung des CellTox™ Green Cytotoxicity Assays	48
Abb. 12 Relative Integrin- α 5-Expression bei unterschiedlichen NZK-Zelllinien	50
Abb. 13 Prozentuale Migration von Zellen der Linien Caki-1 und CCF-RC 1 mit Fibrinogen unterschiedlicher Konzentration (20 bis 200 μ g/ml) als Chemotaxin	52
Abb. 14 Migrationsverhalten der Caki-1-Zellen mit Fibronectin (10 μ g/ml) als Chemotaxin bei Behandlung mit einem Integrin- α 5-Antikörper (P1D6)	53
Abb. 15 Migrationsverhalten der CCF-RC1 Zellen mit Fibronectin (10 μ g/ml) als Chemotaxin bei Behandlung mit einem Integrin- α 5-Antikörper (P1D6)	54
Abb. 16 Adhäsion der Zelllinie Caki-1 an Komponenten der Extrazellulärmatrix	56
Abb. 17 Adhäsion der Zelllinie CCF-RC 1 an Komponenten der Extrazellulärmatrix	57
Abb. 18 Adhäsion der Zelllinien Caki-1 und CCF-RC1 an Fibrinogen unterschiedlicher Konzentration	58
Abb. 19 Adhäsion der Zelllinie Caki-1 an Fibrinogen einer Konzentration 1 mg/ml ..	59
Abb. 20 Adhäsion der Zelllinie CCF-RC1 an Fibrinogen einer Konzentration 1 mg/ml	60
Abb. 21 Immunzytochemische Färbung von Integrin- α 5 auf Caki-1 und CCF-RC1	61

Abb. 22 Einfluss von Fibronectin und Integrin- α 5-Hemmung auf die Expression und Aktivität von Paxillin der Zelllinie Caki-1	63
Abb. 23 Einfluss von Fibronectin und Integrin- α 5-Hemmung auf die Expression und Aktivität von Paxillin der Zelllinie CCF-RC1	64
Abb. 24 Einfluss von Fibronectin und Integrin- α 5-Hemmung auf die Expression und Aktivität von FAK bei der Zelllinie Caki-1	65
Abb. 25 Einfluss von Fibronectin und Integrin- α 5-Hemmung auf die Expression und Aktivität von FAK bei der Zelllinie CCF-RC1	66
Abb. 26 Einfluss von Fibronectin und Integrin- α 5-Hemmung auf die Expression und Aktivität von SRC bei der Zelllinie Caki-1	67
Abb. 27 Einfluss von Fibronectin und Integrin- α 5-Hemmung auf die Expression und Aktivität von SRC bei der Zelllinie CCF-RC1	68
Abb. 28 Einfluss von Fibronectin und Integrin- α 5-Hemmung auf die Expression und Aktivität von SHC bei der Zelllinie Caki-1	69
Abb. 29 Einfluss von Fibronectin und Integrin- α 5-Hemmung auf die Expression und Aktivität von SHC bei der Zelllinie CCF-RC1	70
Abb. 30 Einfluss von Fibronectin und Integrin- α 5-Hemmung auf die Expression und Aktivität von AKT bei der Zelllinie Caki-1	71
Abb. 31 Einfluss von Fibronectin und Integrin- α 5-Hemmung auf die Expression und Aktivität von AKT bei der Zelllinie CCF-RC1	72
Abb. 32 Einfluss von Fibronectin und Integrin- α 5-Hemmung auf die Expression und Aktivität von ERK bei der Zelllinie Caki-1	73
Abb. 33 Einfluss von Fibronectin und Integrin- α 5-Hemmung auf die Expression und Aktivität von ERK bei der Zelllinie CCF-RC1	74
Abb. 34 Proliferation der Zelllinie Caki-1 bei unbehandelten und mit Fibronectin oder Integrin- α 5-Antikörper behandelten Zellen	75
Abb. 35 Proliferation der Zelllinie CCF-RC1 bei unbehandelten und mit Fibronectin oder Integrin- α 5-Antikörper behandelten Zellen	76
Abb. 36 Vergleich des relativen Lumineszenzsignals der Zelllinien Caki-1 und CCF-RC1 gegen die Zeit t[min]	77
Abb. 37 Zytotoxizität der Zelllinie Caki-1 bei der Behandlung der Zellen mit Fibronectin bzw. Integrin- α 5-blockierendem Antikörper	78
Abb. 38 Zytotoxizität der Zelllinie CCF-RC1 bei der Behandlung der Zellen mit Fibronectin bzw. Integrin- α 5-blockierendem Antikörper	79

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Die drei Major-Subtypen des Nierenzellkarzinoms	5
Tab. 2 Neue Subtypen des Nierenzellkarzinoms	7
Tab. 3 Darstellung und Einteilung des Nierenzellkarzinoms anhand der TNM-Klassifizierung	10
Tab. 4 Darstellung der Risikoeinteilung vor Targeted Therapie bei mRCC	15
Tab. 5 Übersicht über die Zusammensetzung und Verwendung von Basalmedien spezifischer Zelllinien.....	34
Tab. 6 Daten und Verbrauch bestimmter Zellkulturflaschen	34
Tab. 7 Extrazellulärmatrixkomponenten und ihre Konzentration	40
Tab. 8 Standardreihe des BSA-Kits von Thermo Scientific.....	44
Tab. 9: Expression bzw. Aktivität der untersuchten Proteine.....	84

1. Einleitung

Die Behandlung maligner Tumoren stellt eine der großen Herausforderungen der medizinischen Entwicklung und Forschung dar. Neben neuen therapeutischen Ansätzen steht die Verbesserung der Lebensqualität und Verlängerung der Überlebenszeit im Fokus. Im Rahmen dieser Arbeit wird der Einfluss der zellmolekularen Grundlagen des Nierenzellkarzinoms (RCC) und dessen Metastasierungsprozesse näher analysiert. Während bei lokal begrenzten Tumoren ein kurativer Ansatz mittels chirurgischer Resektionsverfahren verfolgt werden kann, erfordern metastasierte Tumoren neue Behandlungskonzepte. Aufgrund intrinsischer Chemo- und Bestrahlungsresistenz haben sich als Therapiestrategien die Verwendung von Immuncheckpoint- und Tyrosinkinaseinhibitoren als Hauptpfeiler der Behandlung metastasierter Nierenzellkarzinome etabliert. Je nach Risikoprofil ist eine durchschnittliche Lebenserwartung von 8 Monaten bis 3,5 Jahren unter Therapie zu erwarten. Da vor allem metastatische Prozesse für die eingeschränkte Lebensdauer verantwortlich sind, beleuchtet diese Arbeit die Rolle des Integrin- $\alpha 5\beta 1$, eines Transmembranproteins, beim Nierenzellkarzinom und seine mögliche Rolle als neuer therapeutischer Ansatzpunkt. Diese Beteiligung bei metastatischen Abläufen konnte bereits bei Kolon-, Mama- und Ovarialtumoren nachgewiesen werden. (1-4)

Integrin- $\alpha 5\beta 1$ spielt in Prozessen wie Adhäsion, Migration und Proliferation eine entscheidende Rolle und somit auch bei der Bildung von Metastasen. Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung von Integrin- $\alpha 5\beta 1$ in Bezug auf die oben genannten Prozesse beim Nierenzellkarzinom zu analysieren. Mittels Adhäsions-, Migrations- und Proliferationsversuchen wurde der Einfluss von Integrin- $\alpha 5\beta 1$ am Beispiel der Zelllinien CCF-RC1 und Caki-1 ermittelt. Um die diesen biologischen Abläufen zugrunde liegenden Signalkaskaden zu untersuchen wurden die Proteine Paxillin, FAK (*Focal Adhesion Kinase*), SRC (*Rous sarcoma oncogene cellular homolog*), SHC (*SH2-containing collagen-related kinase*), ERK (*extracellular signal regulated kinase*) 1/2 und PI3K/AKT (*Phosphoinositid-3-kinase/Akt8 virus oncogene cellular homolog*), sowie die jeweils phosphorylierten Analoga mittels SDS-PAGE (*Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamid Gelelectrophoresis*) und Westernblot-Verfahren untersucht. Um den Einfluss von Integrin- $\alpha 5\beta 1$ zu quantifizieren, wurden die ermittelten Ergebnisse zwischen unbehandelten und mit Integrin- $\alpha 5\beta 1$ spezifischen Antikörpern behandelten Proben verglichen.

2. Literaturdiskussion

2.1 Nierenzellkarzinom

2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Weltweit gesehen steht das Nierenzellkarzinom in seiner Häufigkeit an dreizehnter Stelle. Hierbei sind regional starke Unterschiede zu bemerken. In westlich-entwickelten Ländern wie Nordamerika, Europa und Australien liegt eine deutlich höhere Inzidenz vor als im Vergleich zu anderen Ländern, z.B. Indien, Japan, China oder Afrika. Europaweit gesehen belegt das Nierenzellkarzinom Rang zehn, wobei auch hier deutlich regionale Unterschiede auffallen (5). Laut der letzten Ausgabe des deutschen Krebsregisters von 2018 belegt Deutschland im weltweiten Vergleich Rang 8 bzw. 9 bei Frauen und Männern (Abb. 1). Hierbei ist eine erhöhte Inzidenz in den östlichen Bundesländern auffällig (6).

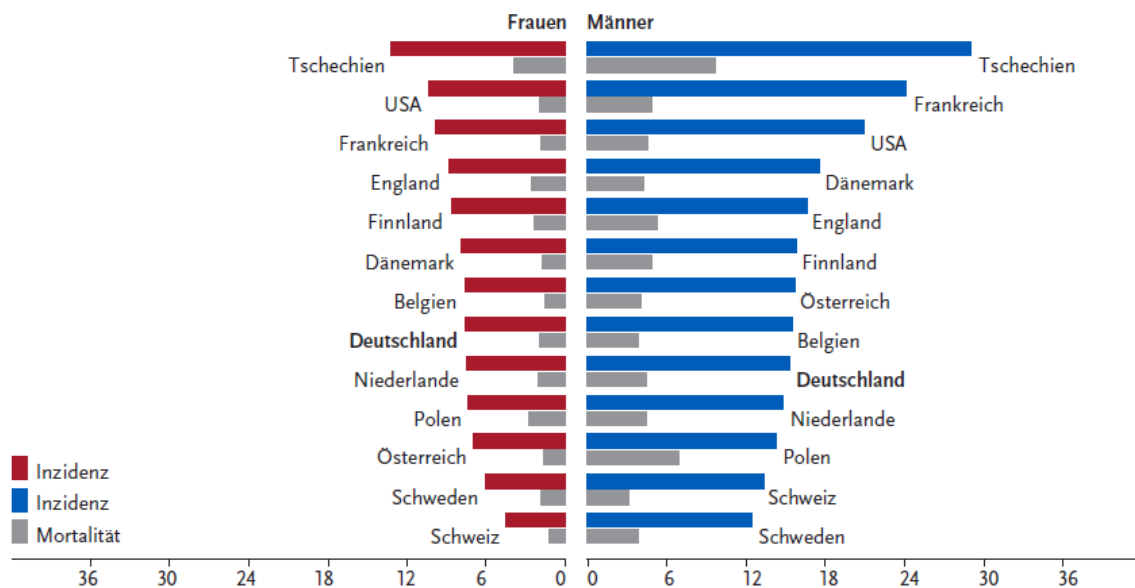


Abb. 1 Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberate beim Nierenzellkarzinom im internationalen Vergleich nach Geschlecht, 2017-2018 oder letztes verfügbare Jahr je 100.000, nach ZKD und RKI (6)

Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 68 Jahren, für Frauen bei 71 Jahren. Bezogen auf die Mortalitätsrate belegt Deutschland einen mittleren Rang. 7,9 Männer bzw. 4,6 Frauen bezogen auf 100.000 Personen starben im Jahr 2019 an dieser Erkrankung. Das mittlere Sterbealter betrug 77 Jahre für Männer und 81 Jahre für Frauen. Die Neuerkrankungsrate beträgt 3,5% bei Männern bzw. 2,4% bei Frauen (Abb. 2) (6).

2. Literaturdiskussion

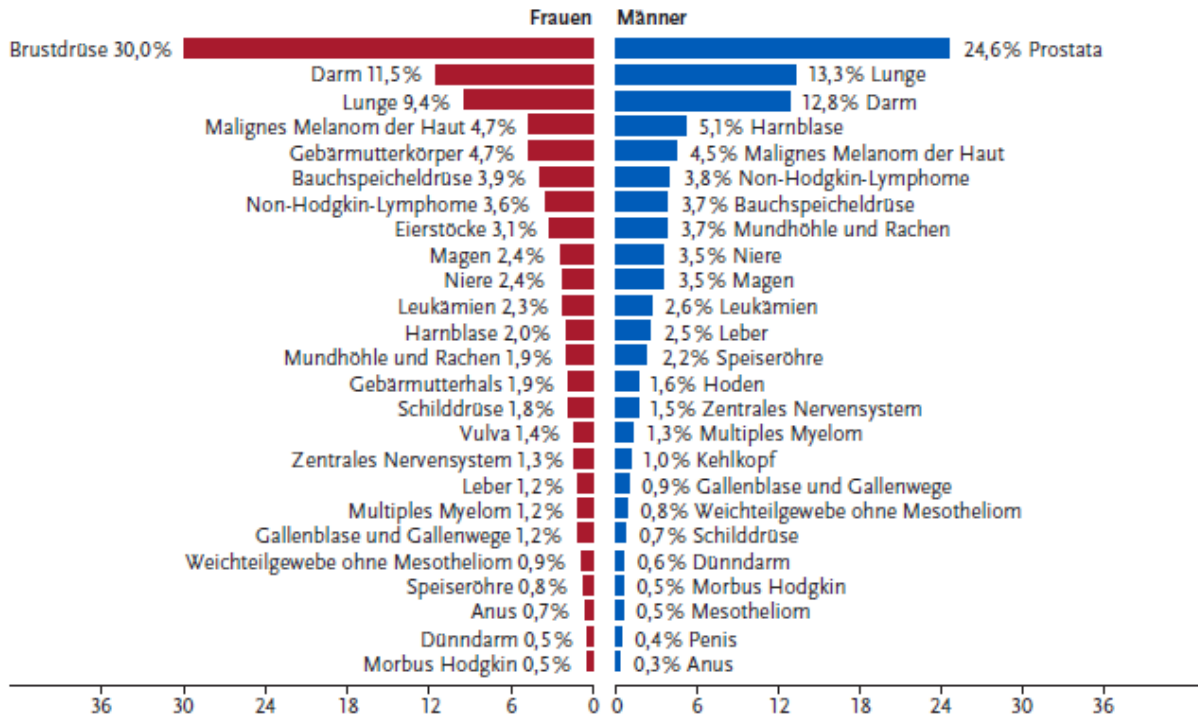


Abb. 2 Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen aller Tumorneuerkrankungen in Deutschland 2018 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs), nach ZKD und RKI (6)

Im Laufe von vielen Jahren kontinuierlicher Forschung wurde eine Vielzahl an Risikofaktoren eruiert, wie die bereits oben beschriebenen Faktoren Alter, Geschlecht und Rasse (5). Ein statistisch signifikanter Einfluss konnte für das Zigarettenrauchen festgestellt werden. Ebenso haben offenbar phenacetinhaltige Schmerzmittel, Übergewicht und Bluthochdruck einen Einfluss auf die Entstehung von Nierenzellkarzinomen (7). Als weiterer Risikofaktor sind die Ess- und Lebensgewohnheiten anzusehen. Lee *et al.* konnten zeigen, dass das Erkrankungsrisiko durch gemüse- und obstreiche Ernährung gesenkt werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde bei einer vor allem auf tierischen Fetten basierenden Ernährung ein erhöhtes Risiko aufgezeigt (8). Alkohol senkt bei moderatem Konsum (72-144g reiner Alkohol pro Woche) das Erkrankungsrisiko (9, 10). Auch eine verminderte körperliche Betätigung erhöht das Erkrankungsrisiko (11). Als berufsbedingte Risikofaktoren sind einige Stoffe in Verbindung mit der Entstehung von Nierenzellkarzinomen zu nennen, wobei das Nierenzellkarzinom nicht als Berufserkrankung anerkannt werden kann. Allen voran ist Trichlorethylen als meistuntersuchte Substanz zu nennen. Ein Zusammenhang zwischen Trichlorethylen und dem Auftreten von Nierenzellkarzinomen wurde zuletzt durch Buhagen *et al* 2016

bestätigt (12) Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zu anderen berufsbedingten Expositionen, wie Glasfasern, Mineralwolle oder Ziegelstaub hergestellt werden (13).

4% aller Nierenzellkarzinome sind auf familiäre genetische Dispositionen zurückzuführen (14). Besonders hervorzuheben ist das autosomal-dominant vererbte von Hippel Lindau (VHL)-Syndrom. Bei diesem kommt es durch Mutation des von Hippel Lindau Gens zu einer Akkumulation von *hypoxia inducing factor alpha* (HIF- α). Als Folge dieser Akkumulation kommt es zu vermehrter Neoangiogenese, sowie einer progredienten Wachstumsstimulation (Abb. 3) (15).

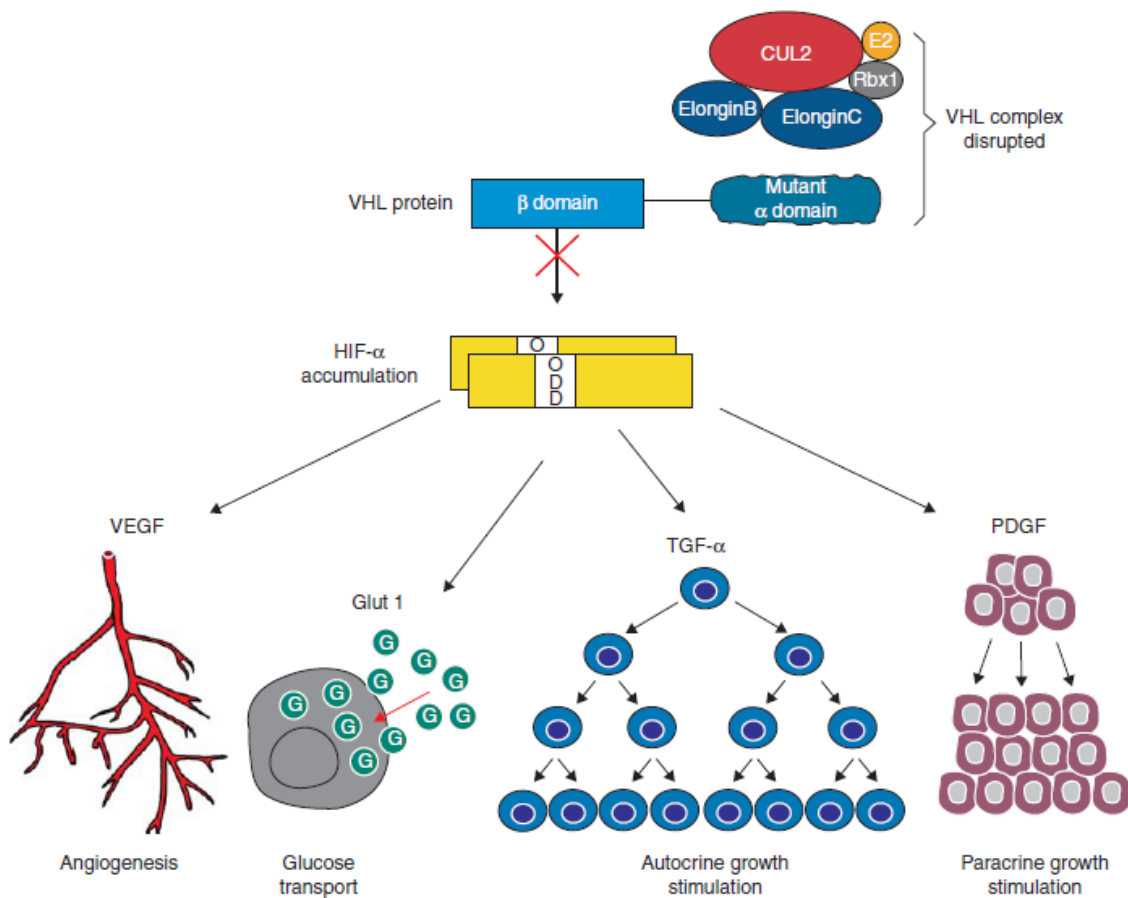


Abb. 3 Molekulare Zielstrukturen im VHL Signalweg des klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Mutationen des von Hippel-Lindau Gens führen durch die Akkumulation von HIF- α zu einer erhöhten Transkription von VEGF, GLUT1 und TNF- α . Im Zuge dessen kommt es zu einer erhöhten Neoangiogenese, einer erhöhten Glukoseaufnahme nach intrazellulär, sowie zu einer erhöhten auto- und parakrinen Wachstumsstimulation der Tumorzellen. Verändert nach Pfaffenroth EC und Lineham WM (15)

2.1.2 Histologische Typen und deren Einteilung

Das Nierenzellkarzinom kann in verschiedene histopathologische Typen eingeteilt werden. Im Jahr 2016 wurde eine neue Einteilung durch die WHO (*World Health Organisation*) basierend auf der ISUP (*International Society of Urological Pathology*) Einteilung von Vancouver vorgenommen (16, 17). Zunächst werden die Major-Subtypen des Nierenzellkarzinoms aufgezeigt (Tab. 1).

Tab. 1 Die drei Major-Subtypen des Nierenzellkarzinoms, nach Inamura K. (18)

Renal Cell Tumor Subtypes	Clinical Features	Morphological/Immunohistochemical Features	Molecular Features
CCRCC	65-70% of adult RCCs	Clear/eosinophilic cells with thin-walled, staghorn-shaped vasculature; positive for CAIX and CD10, negative for CK7 and AMACR	Loss of function of <i>VHL</i> , Chr 3p deletion, inappropriate stabilization of HIFs, genetic mutations in PI3K/AKT pathway, mutations of <i>SETD2</i> , <i>BAP1</i> , and <i>MTOR</i> , aggressive CCRCC demonstrating a metabolic shift
PRCC	15-20% of adult RCCs, type 1 shows a better prognosis than type 2	Papillary structure, foamy macrophages; type 1: scanty cytoplasm; type 2: abundant eosinophilic cytoplasm; positive for CD10, CK7, and AMACR, negative for CAIX	Gain of Chr 7 and/or Chr 17, loss of Chr Y; type 1: <i>MET</i> alteration; type 2: <i>CDKN2A</i> silencing, <i>SETD2</i> mutation; three subtypes according to the TCGA, including CIMP-associated aggressive subtype with an <i>FH</i> mutation
ChRCC	5-7% of adult RCCs, favorable prognosis, Birt-Hogg-Dube syndrome with an <i>FLCN</i> mutation	Prominent cell membrane, irregular nuclei, perinuclear halo, pale to eosinophilic cytoplasm; positive for KIT and CK7, negative for CAIX and CD10	Loss of Chrs 1, 2, 6, 10, 13, and 17, somatic mutation in mitochondrial DNA, mutations of <i>TP53</i> and <i>PTEN</i> , imbalanced chromosome duplication (ICD), high <i>TERT</i> expression by DNA rearrangement within the <i>TERT</i> promoter region with kataegis

CCRCC, clear cell RCC; Chr, chromosome; ChRCC, chromophobe RCC; CIMP, CpG island methylator phenotype; HIF, hypoxia-inducible factor; PRCC, papillary RCC; RCC, renal cell carcinoma; TCGA, The Cancer Genome Atlas; VHL, von Hippel Lindau; WHO, World Health Organization.

Klarzelliges Nierenzellkarzinom (ccRCC):

Mit 65-70% aller RCC ist das klarzellige Nierenzellkarzinom mit Abstand der häufigste histopathologische Subtyp. Makroskopisch imponiert der Tumor durch seine gelbe Farbe mit hämorrhagisch-nekrotisierenden Arealen. In der histologischen Untersuchung fallen dem Betrachter klare bis eosinophile Zellen auf, welche dünnwandig begrenzt sind. Auffällig ist die hirschhornartige Vaskularisationsstruktur des Tumorgewebes (Abb. 4, A) (18). Immunhistochemisch kann das ccRCC gut von anderen renalen Tumorentitäten abgegrenzt werden. So weisen ccRCC eine positive Reaktion auf CA IX (*Carboanhydrase 9*) und CD10 (*Cluster of differentiation 10*), sowie eine negative Reaktion auf CK7 (*Zytokeratin 7*) und AMACR (*Alpha-Methylacyl-CoA Racemase*) auf.(19) Auf genetischer Ebene liegt in nahezu allen Fällen eine Mutation des von Hippel-Lindau Gens vor. Des Weiteren weist der PI3K/AKT/mTOR (*mechanistic Target of Rapamycin*) Signalweg häufig Mutationen auf (19).

Papilläres Nierenzellkarzinom (pRCC):

Mit einer Häufigkeit von 15-20% stellt das papilläre Nierenzellkarzinom die zweithäufigste histopathologische Nierenzelltumorentität dar. Präparate mit bröckeligen, nekrotisch-hämorrhagischen Veränderungen werden in der Regel dem Pathologen zur Beurteilung eingeschickt. Unter der mikroskopischen Betrachtung zeigen sich papilläre Formationen auf fibrovaskulären Mittelstrukturen. Zusätzlich können schaumige Makrophagen vorliegen (Abb.4, B). Bei genauerer Betrachtung kann das papilläre Nierenzellkarzinom histologisch in zwei Subtypen unterteilt werden. Diese weisen unterschiedliche genetische Besonderheiten auf. Subtyp 1 imponiert durch Veränderungen im MET (*MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*)-Formenkreis, Subtyp 2 weist CDKN2 (*Cyclin dependent kinase inhibitor 2*)-Asilencen, SETD2 (*SET domain containing 2*)-Mutationen und NRF2 (*Nuclear factor erythroid-2-related factor 2*)-Antioxidans-Veränderungen auf (18).

Chromophobes Nierenzellkarzinom (chRCC):

5-7% der Nierenzellkarzinome weisen nach histologischer Untersuchung die Merkmale des chromophoben Nierenzellkarzinoms auf. Die hell- bis mahagoni-braune Farbe des Präparates liefert bereits in der makroskopischen Betrachtung einen Hinweis darauf. Histologisch zeigen sich prominente Zellmembranen mit irregulären Nuclei, teilweise mit perinukleären Halo-Zeichen. Das Zytoplasma ist wie bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen blass bis eosinophil (Abb. 4, C). In der immunhistochemischen Färbung zeigen sich positive Färbungen auf KIT (*KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*) und CK7, negative Färbungen auf CAIX und CD10 (18). Vor allem letztere eignen sich zur Abgrenzung des chromophoben von einem klarzelligen Nierenzellkarzinom. Bei einem ccRCC liegen im Regelfall positive Reaktionen auf CAIX und CD10 vor. Auf genetischer Ebene haben Untersuchungen Verluste im Bereich der Chromosomen 1, 2, 6, 10, 13 und 17 aufgezeigt. Auf Ebene der Signalkaskaden sind häufig das PTEN- (*Phosphatase and tensin homolog*) und TP53 (*tumor protein p53*)-Gen verändert (20).

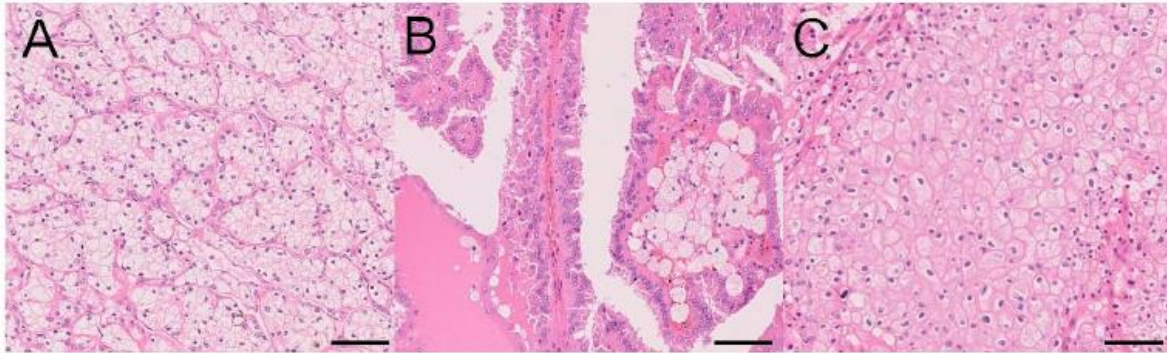


Abb. 4 Morphologie der drei Major-Subtypen des Nierenzellkarzinoms in Hematoxylin-Eosin Färbung

Größenbalken = 100 μ m **(A)** klarzelliges Nierenzellkarzinom, klare Zellen mit dünn bewandeter, hirschhornartiger Vaskularisation **(B)** papilläres Nierenzellkarzinom, papillenartige Struktur auf fibrovaskulären Kernstrukturen, häufig mit schaumartigen Makrophagen **(C)** chromophobes Nierenzellkarzinom, klare neben eosinophilen Zellen mit voluminösem Zytoplasma, perinukleären Aufhellungen und klar abgrenzbaren Zellstrukturen. Verändert nach Inamura, K (18)

Im Jahre 2016 wurden sieben neue Subtypen des Nierenzellkarzinoms in die Tumorklassifikation durch die WHO aufgenommen. Tab. 2 zeigt die sieben neuen Subtypen, sowie ihre klinischen, histologischen/immunohistochemischen und molekularen Besonderheiten.

Tab. 2 Neue Subtypen des Nierenzellkarzinoms, nach Inamura, K. (18)

New Renal Cell Tumor Subtypes	Clinical Features	Morphological/Immunohistochemical Features	Molecular Features
Multilocular cystic renal neoplasm of low malignant potential	Excellent prognosis	Numerous cysts lined by clear cells; positive for CAIX and CK7	<i>VHL</i> mutation, Chr 3p deletion
MiT family TRCC	Pediatric to young adult patients, mean age of 30 years	Papillary pattern, psammoma bodies, large epithelioid cells and small cells; positive for TFE3 or TFEB	Xp11 TRCC: <i>TFE3</i> rearrangement, t(6;12) RCC: <i>TFEB</i> rearrangement
Tubulocystic RCC	Male predominance, mean age of 60 years, indolent	Dilated tubules with a single layer of cells	Gain of Chrs 7 and 17, loss of Chr Y
ACD-associated RCC	End-stage renal disease or ACD, indolent	Eosinophilic cytoplasm, sieve-like pattern, intratumoral oxalate crystals; positive for AMACR and CD10, negative for CK7	Gain of Chrs 3, 16, and Y
CCPRCC	3–4% of renal tumors, indolent, end-stage renal disease, <i>VHL</i> disease	Clear cytoplasm, papillary pattern, apical-oriented nuclei; positive for CK7 and CAIX, negative for CD10	Lack of the genomic alterations observed in CCRCC/PRCC

2. Literaturdiskussion

New Renal Cell Tumor Subtypes	Clinical Features	Morphological/Immunohistochemical Features	Molecular Features
SDH-deficient RCC	0.05–0.2% of renal carcinomas, mean age of 37 years, good prognosis, germline mutation in one of the <i>SDH</i> genes	Cytoplasmic vacuoles and inclusion-like spaces; negative for SDHB, KIT, and CK7	Double-hit inactivation of one of the <i>SDH</i> genes, most commonly <i>SDHB</i> , no mutations in <i>VHL</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>AKT</i> , <i>MTOR</i> , <i>MET</i> , or <i>TP53</i>
HLRCC-associated RCC	HLRCC syndrome, aggressive	Large nuclei with inclusion-like eosinophilic nucleoli and perinuclear clearing, abundant eosinophilic cytoplasm, papillary/tubular pattern; positive for S-(2-succino)-cysteine (2SC), negative for FH, CK19, 34betaE12, and CK7	Germline mutation in <i>FH</i> , metabolic shift to aerobic glycolysis, increased fumarate and HIF1A

ACD, acquired cystic disease; CCPRCC, clear cell papillary RCC; CCRCC, clear cell RCC; Chr, chromosome; HLRCC, Hereditary leiomyomatosis and RCC; MiT, microphthalmia transcription factor; PRCC, papillary RCC; RCC, renal cell carcinoma; SDH, succinate dehydrogenase, TRCC, translocation RCC; VHL, von Hippel Lindau; WHO, World Health Organization.

2.1.3 Symptome

Das Nierenzellkarzinom stellt sich als symptomarme Tumorerkrankung dar. Die nach Lehrbuchmeinung klassische Trias aus schmerzloser Makrohämaturie, Flankenschmerzen und palpabler Tumormasse tritt nur in ca. 6-10% aller Nierenzellkarzinome auf (21). Schon das Vorliegen eines dieser Symptome ist mit einer schlechteren Prognose bzw. dem Vorliegen einer fortgeschrittenen Erkrankung vergesellschaftet (21, 22). Allgemeine Erkrankungszeichen wie Fieber unklarer Genese, Nachtschweiß, Gewichtsverlust (diese drei bilden den B-Symptomatikkomplex), Müdigkeit und Anämiezeichen geben meist einen ersten, unspezifischen Hinweis auf das Vorliegen eines Tumorgeschehens (21). Bei schon weiter fortgeschrittenen oder metastasierten Tumoren können Symptome der Metastasen das Krankheitsgeschehen dominieren. Knochenschmerzen oder pathologische Frakturen (Fraktur ohne adäquates Trauma) sind Hinweise auf das Vorliegen von Knochenmetastasen. Dauerhafter Reizhusten oder Dyspnoe können im Rahmen pulmonaler Metastasen auftreten. Bei neurologischen Symptomen sollte auch die Möglichkeit einer zerebralen Metastasierung bedacht und mittels Bildgebung ausgeschlossen werden (23).

Bei bis zu 20% der erkrankten Patienten zeigen sich als Primärsymptome paraneoplastische Syndrome. Bei bereits erkrankten Patienten weisen sie auf die Entstehung eines Rezidivs hin. Fast alle Organsysteme können betroffen sein (24).

Hyperkalzämie (primär durch Zellmediatoren, sekundär durch ossäre Metastasen), Hypertonus, sowie hämatologische Symptome (Tumoranämie, Polyzytämien) sind hierbei zu beobachten. Das Stauffer-Syndrom wurde im Rahmen des Nierenzellkarzinoms ebenfalls beschrieben. Hierbei handelt es sich um eine generelle

Hepatitis mit lymphozytärer Infiltration. Es kommt zu Degeneration von Leberzellen und im Rahmen dessen zu erhöhten Leberwerten im Laborbericht. Auch neurologische und kutane Symptome können Hinweise auf eine Tumorentstehung sein (24-26).

2.1.4 Diagnostik des Nierenzellkarzinoms und TNM-Klassifikation

Die Diagnostik wird angelehnt an die S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms mit der jeweiligen wissenschaftlichen Gewichtung dargestellt (27).

Die Diagnostik des Nierenzellkarzinoms erfolgt in heutiger Zeit nur noch selten auf klinischer Ebene, da die klassische Symptomtrias nur selten anzutreffen ist. Im Rahmen bildgebender Routineuntersuchungen, z.B. Prostatavorsorge, präoperative Diagnostik bei abdomineller Operation, etc. werden heutzutage mehr als 50% aller Nierenzellkarzinome inzidentell diagnostiziert (28). In der Regel fallen renale Strukturveränderungen schon in sonographischen Untersuchungen auf. Diese sollten im Rahmen der weiteren Abklärung mittels einer kontrastmittelgestützten Computertomographie (CT) (A 1+) oder Magnetresonanztomographie (MRT) des Abdomens ergänzt werden (B 1+) (21, 23, 27). Nur in Ausnahmefällen kann auch eine Biopsie erwogen werden (Expertenkonsens) (27). Diese sollte mindestens zwei Biopsien enthalten und kann entweder mittels Feinnadelaspiration oder mittels perkutaner Stanze unter bildgebender Kontrolle durchgeführt werden. Zur Durchführung einer Probenentnahme wird nur in zwei Szenarien geraten: vor ablativen Therapieverfahren und vor Einleitung systemischer Therapien bei metastasiertem Tumor zur besseren Therapieplanung (Expertenkonsens) (27). In Studien konnte dieser Nutzen mehrmals validiert werden. Ebenso zeigte sich, dass das Streuungsrisiko der Tumorzellen bei Probengewinnung als gering anzusehen ist. Es zeigte sich auch eine hohe Spezifität und Sensitivität für beide Verfahren (29-32).

Bei begründetem Verdacht (klinisch, diagnostisch, histologisch) auf das Vorliegen eines Nierenzellkarzinoms (Kontrastmittelaufnahme in der CT) sollte ein Staging durchgeführt werden. Dieses setzt sich zusammen aus kontrastmittelgestützter CT des Thorax und einer Ganz-Körper low-dose CT oder MRT zur Detektion ossärer Metastasen (Expertenkonsens) (27). Die Untersuchung des Schädels mittels Magnetresonanztomographie (MRT) und Kontrastmittel sollte nur bei klinischem Verdacht durchgeführt werden (Expertenkonsens) (27). Die hierbei gewonnenen Parameter über Tumorgöße, Lymphknotenbefall und Ausbreitung bzw.

Fernmetastasierung können durch die TNM-Klassifikation nach AJCC zusammengefasst werden (Tab. 3) (33, 34).

Tab. 3 Darstellung und Einteilung des Nierenzellkarzinoms anhand der TNM-Klassifizierung

Untergruppen aus Übersichtsgründen nicht aufgeführt. Verändert nach Amin, MB und Swami, U (33, 34)

TNM-Klassifikation	Beschreibung
Tx	Bewertung Primärtumor nicht möglich
T0	Kein Hinweis auf Primärtumor
T1	Tumor auf Niere beschränkt, ≤ 7cm
T2	Tumor auf Niere beschränkt, > 7 cm
T3	Tumor infiltriert große Venen, Nebenniere oder perinephrisches Gewebe, nicht die Gerotafaszie
T4	Tumor überschreitet Gerotafaszie
Nx	Bewertung regionaler Lymphknoten nicht möglich
N0	Kein Befall regionaler Lymphknoten
N1	Befall eines regionalen Lymphknotens
N2	Befall >1 regionalen Lymphknotens
Mx	Bewertung entfernter Metastasen nicht möglich
M0	Keine entfernten Metastasen
M1	Vorliegen entfernter Metastasen

Stadium	TNM- Beschreibung
I	T1 N0 M0
II	T2 N0 M0
III	T1-2 N1 M0 T3 N0-1 M0
IV	T4 N0-1 M0 Jedes T N2 M0 Jedes T und N M1

Die Wissenschaft ist immer noch auf der Suche nach relevanten Tumormarkern als Frühindikator, sowohl für die Ausbreitung des Tumors, als auch für Therapieerfolgs-

und Prognosefaktoren. Obwohl zahlreiche Untersuchungen durchgeführt wurden (35-42), konnte bisher kein Marker valide etabliert werden.

2.1.5 Therapie und Prognose

Die Therapie von renalen Tumorerkrankungen ist ein sehr komplexes Arbeitsfeld. Wichtigstes Entscheidungskriterium der Therapieplanung stellt hierbei das TNM-Stadium des Tumors da.

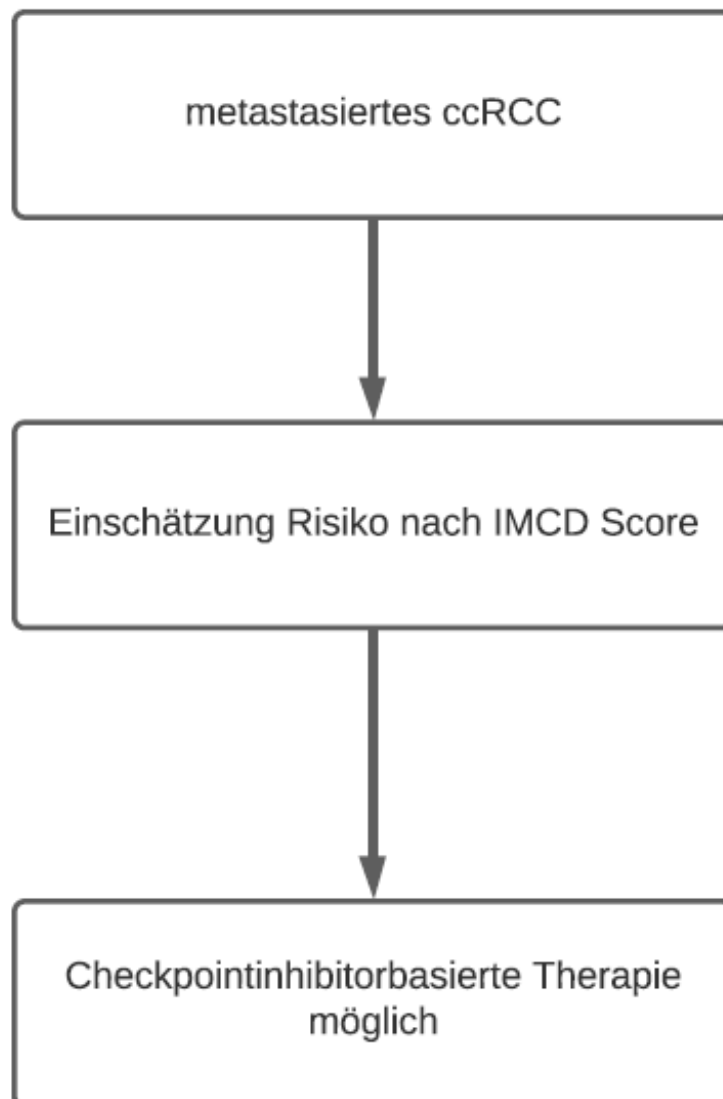
Bei lokal begrenzten Tumoren stellt das Mittel der Wahl die chirurgische Resektion des Tumors dar. Hauptansatz ist hierbei eine kurative, das heißt heilbare, Intention der Behandlung. Bei Tumoren kleinerer Größe (bis Stadium T1b) können vor allem partielle, nierenerhaltende Nephrektomieverfahren eingesetzt werden. Man differenziert zwischen minimalinvasiven, laparoskopischen oder roboterassistierten gegenüber den standardmäßigen offenen Operationsverfahren (43-50).

Bei metastasierten oder nicht resektablen Tumoren werden andere therapeutische Wege eingeschlagen. Hierbei muss von einem meist nicht kurativen, das heißt nicht heilbaren, Zustand des Patienten ausgegangen werden. Entgegen dem Vorgehen bei vielen anderen Tumorentitäten ist eine Chemotherapie bei renalen Karzinomen wegen des nicht nachweisbaren Nutzens bei hohem Nebenwirkungsprofil nicht indiziert (51). In der neueren Zeit haben vor allem sogenannte zielgerichtete Therapieverfahren (*targeted therapies*) die Therapie fortgeschrittener Nierenkarzinome verändert. Je nach IMDC-Risikoevaluation (*International metastatic RCC database consortium*) (s. Tabelle 2) (52) und Möglichkeit einer Checkpointinhibitor-Kombinationstherapie kommen verschiedene Substanzen zum Einsatz. Als gemeinsamer Medikamentenpool haben sich folgende Substanzen etabliert (53-65):

- Immuncheckpointinhibitoren: Avelumab (PD-1L [*programmed cell death 1 ligand 1*] Antikörper), Ipilimumab (CTLA-4 [*Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4*] Antikörper), Nivolumab (PD-1 [*Programmed cell death protein 1*] Antikörper), Pembrolizumab (PD-1 Antikörper)
- Tyrosinkinaseinhibitoren: Axitinib, Cabozantinib, Lenvatinib, Pantozanib, Sunitinib
- VEGF (*Vascular endothelial growth factor*)-Antikörper: Bevacizumab (in Kombination mit Interferonen)

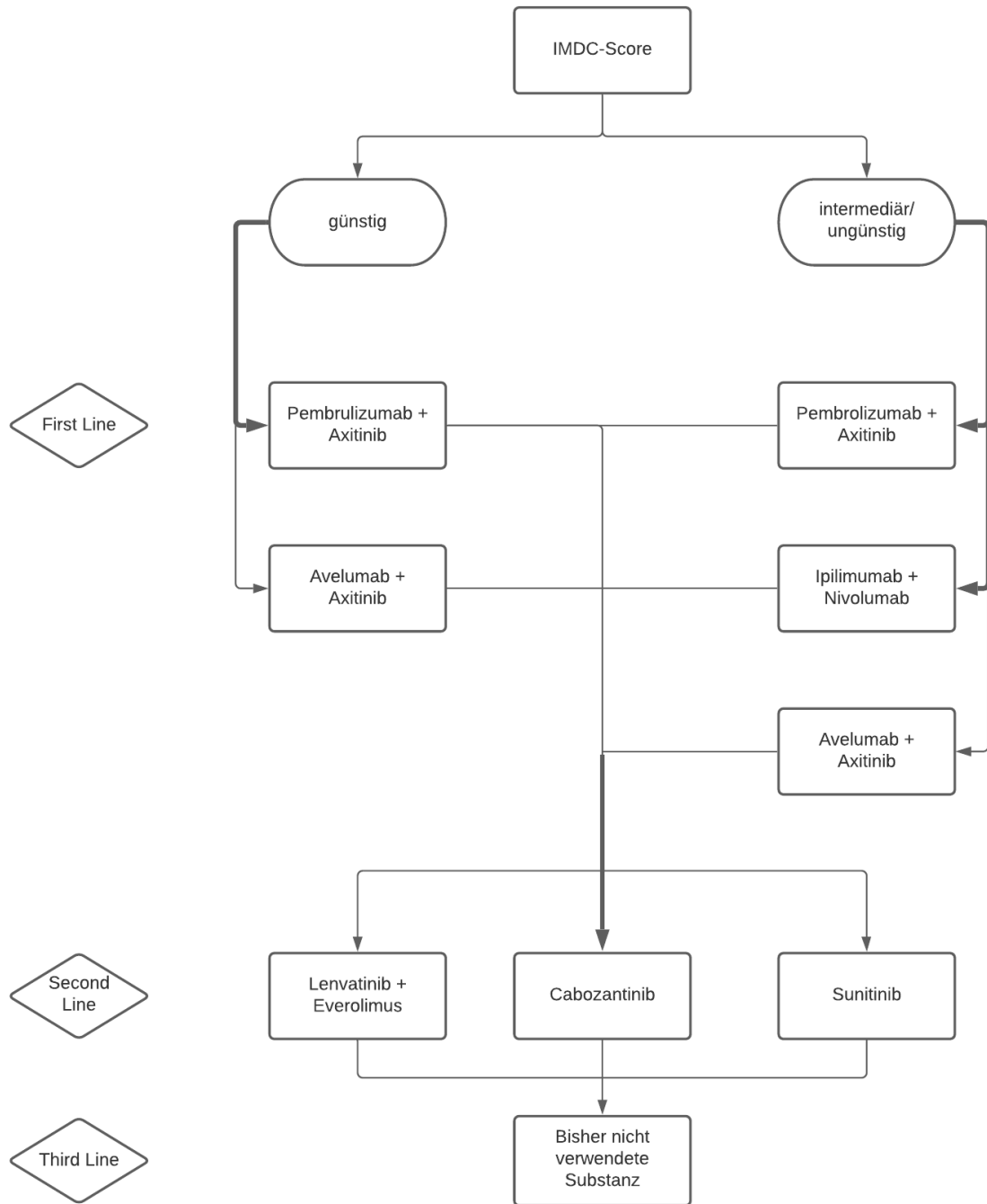
- mTOR-Inhibitoren: Everolimus, Temsilorimus

Da es sich bei der medikamentösen Tumorthherapie des metastasierten klarzelligem Nierenzellkarzinoms um eine komplexe Therapie handelt, wird auf unten folgende Abbildungen, sowie die S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms verwiesen (Abb. 5) (27).



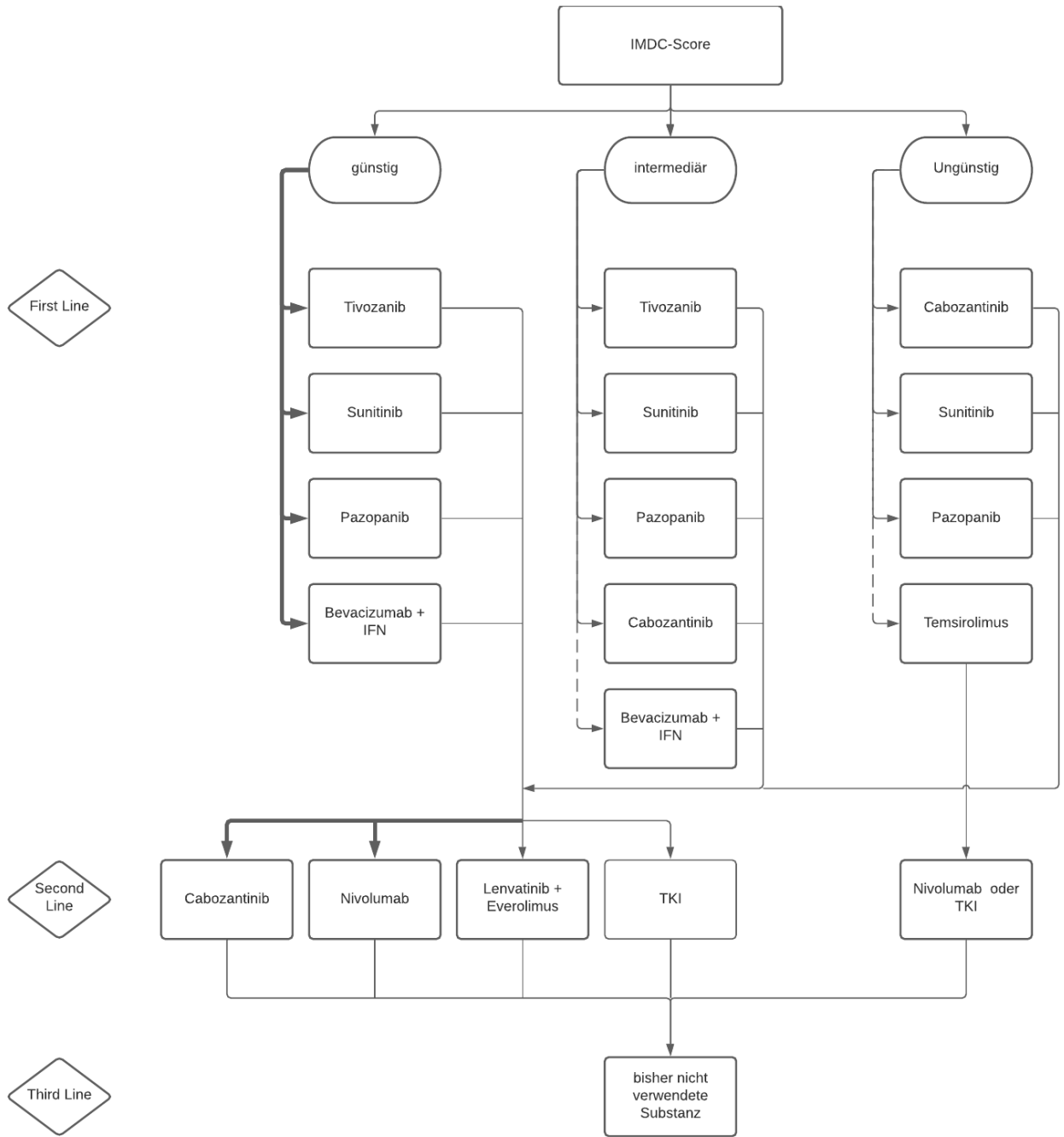
A

2. Literaturdiskussion



B

2. Literaturdiskussion



C

Abb. 5 Therapieschema des metastasierten Nierenzellkarzinoms, modifiziert nach AWMF-Leitlinie

Nach Einteilung des Risikos nach IMDC-Score und Möglichkeit einer Checkpointinhibitor-basierten Kombinationstherapie (A) sind zunächst die Therapieempfehlungen bei der Möglichkeit einer CKI-Kombinationstherapie (Cyklin dependent kinase inhibitor) (B) und nachfolgend bei nicht möglicher Kombinationstherapie aufgezeigt (C). Die Dicke der Verbindungslinien korreliert mit der empfohlenen Strategie (27).

Für die Prognoseeinschätzung wurden mehrere Prognose-Scores und Formeln erarbeitet.

Anhand der IMDC-Scores kann das mediane Überleben der Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung nach erfolgter Therapie prognostisch abgeschätzt werden. So beträgt dieses bei günstigem Prognoseprofil ca. 43,2 Monate, bei intermediärem Prognoseprofil 22,5 Monate und bei ungünstigem Prognoseprofil 7,8 Monate (Tab. 4) (52).

Tab. 4 Darstellung der Risikoeinteilung vor Targeted Therapie bei mRCC, nach IMDC

Pro erfülltem Risikofaktor erhält der Patient einen Risikopunkt. Die Einteilung erfolgt von günstigem Score (keine Risikofaktoren, medianes Überleben 43,2 Monate) über intermediärem Score (ein bis zwei Risikofaktoren, medianes Überleben 22,5 Monate) zu ungünstigem Score (drei oder mehr Risikofaktoren, medianes Überleben 7,8 Monate) (52).

Risikofaktor	Risikopunktkriterium
Karnofsky-Index	<80%
Zeit von Diagnose bis Therapiebeginn	< 12 Monate
Hämoglobin	< untere Grenze der Laborreferenz
Kalziumkonzentration	> obere Grenze der Laborreferenz
Absolute Neutrophilenzahl	> obere Grenze der Laborreferenz (Neutrophilie)
Thrombozytenanzahl	> obere Grenze der Laborreferenz (Thrombozytose)

Während bei fortgeschrittenem Krankheitsverlauf der IMDC-Score Verwendung findet, werden bei lokal begrenzten Tumoren andere Scores verwendet. Im präoperativen Setting haben sich hier vor allem die Cindoloformel- (66, 67) und die Yacyioglu-Formel (68) etabliert. Diese sollen vor allem das Rezidivrisiko nach Operation beziffern. Bei beiden Modellen werden folgende Parameter berücksichtigt: Performance Status, Auftreten von Metastasen abhängig von Ort und Zeit, Hämoglobinkonzentration, Thrombozytenzahl, Neutrophilenzahl und LDH (66-68).

Im postoperativen Setting haben sich neben dem hauptsächlich verwendeten UCLA-ISS Modell (*University of California integrated staging system*) (hierbei werden TNM, ECOG [*Eastern Cooperative Oncology Group*] und Fuhrmann-Grad berücksichtigt)

viele weitere Modelle wie der SSIGN-Score (*Mayo Clinic stage, size, grade and necrosis score*) oder der Leibovich-Score einen Namen gemacht (69-74).

2.1.6 Metastasierung des Nierenzellkarzinoms

Wie bei allen aggressiven, malignen Tumoren zeigt auch das Nierenzellkarzinom eine Tendenz im unbehandelten Krankheitsverlauf zu metastasieren. Zum einen breitet sich der Tumor lokal in umgebende Strukturen aus. Zum anderen werden durch Streuung von Tumorzellen über die Lymphbahnen diverse Lymphknoten befallen. Primär betroffen sind hierbei die paraaortalen, die parakavalen, die retroperitonealen und die nahe dem Nierenhilus gelegenen Lymphknoten. Ebenso kann eine hämatogene Ausbreitung in fern gelegene Organe stattfinden. Hierbei sind in absteigender Reihenfolge folgende Organe betroffen: Lunge (60%), Leber (30-40%), Knochen (30-40%) und zentrales Nervensystem (5-15%) (14).

Die allgemeinen Mechanismen und biophysiologicalen Abläufe werden im nächsten Abschnitt näher beleuchtet.

2.2 Metastasierung

Eine Metastase ist definiert als eine Ausbreitung beziehungsweise Auswanderung von lokalen Tumorzellen in umgebendes Gewebe oder entfernt liegende Organe. Dies wird auch in der Wortbedeutung *μετάσταση* (*metastase*) deutlich, welche im Deutschen mit dem Begriff Auswanderung/Wanderung bezeichnet werden kann (75). Metastasierte Tumoren sind häufig nicht kurabel therapierbar. Aus diesem Grund ist ein metastasiertes Tumorleiden für über 90% der tumorassoziierten Todesfälle verantwortlich (76, 77). Die äußerst komplexen Mechanismen in der Entstehung einer systemischen, lebensbedrohlichen Erkrankung aus einer einzelnen Tumorzelle sind heutzutage noch nicht vollständig aufgeklärt. Allerdings zeichnet sich ein immer tiefer gehenderes Verständnis in die molekularbiologischen Abläufe der Metastasierung ab.

Eine durch Mutationen entstandene Tumorzelle muss zunächst gewisse Voraussetzungen erfüllen, um lokal zu wachsen und zu expandieren. Diese Voraussetzungen werden unter dem englischen Begriff „Hallmarks of cancer“ zusammengefasst: Aufrechterhaltung proliferativer Signale, Überkommen wachstumshemmender Einflüsse, Aktivierung von invasiven und metastatischen Zellveränderungen, Durchbrechen replikativer Abbruchmechanismen und hierdurch Erlangung replikativer Unsterblichkeit, die Befähigung Angiogenese zu betreiben,

Widerstandsmechanismen gegen Apoptose zu entwickeln, Entkommen der körpereigenen Immunantwort, Deregulierung zellulärer Energiekreisläufe, Ausbildung einer tumorspezifischen Mikroumgebung (meist chronisch inflammatorisches Gewebe) und Aufweisung von Genominstabilität und Mutationen (78).

Ist ein Tumor lokal fortgeschritten, läuft die Metastasierung in zwei Phasen ab (76). Zunächst kommt es zur physischen Translokation von Tumorzellen vom Primarius zu entfernten Organen. Dies kann sowohl auf lymphogenem, als auch hämatogenem Weg geschehen (79, 80). Diese Phase kann in fünf Schritte unterteilt werden: Invasion, Intravasation, Überleben während der vaskulären Zirkulation, Extravasation, Ruhezustand (76-78, 81, 82). In der zweiten Phase kommt es zur aktiven Kolonisierung im fernen Organ und Ausbildung einer Makrometastase (76). Im folgenden Abschnitt soll näher auf die einzelnen Phasen und ihre molekularbiologischen Abläufe eingegangen werden.

2.2.1 Allgemeine Metastasierungsprozesse

Invasion

Der Prozess der Invasion beschreibt die Fähigkeit einzelner Tumorzellen oder kleiner Tumorzellverbände sich lokal auszubreiten und umgebendes Gewebe zu infiltrieren (83). Die hierarchische Struktur des Primärtumors bildet den ersten Einflussfaktor. Den Cancer Stem Cells (CSC), welche stammzellähnliche Eigenschaften, wie die dauerhafte Selbstreplikation, eine erhöhte Chemoresistenz, sowie große Strukturvarianz besitzen, kommt hierbei eine entscheidende Rolle zu (84, 85). Sie können auf zwei Arten gebildet werden. Einerseits können durch intrinsische Mechanismen differenzierte Tumorzellen zu CSCs umgewandelt werden (76). Andererseits kann durch die Rekrutierung eines reaktiven Stromas (bestehend aus Fibroblasten, Myofibroblasten, Granulozyten, Makrophagen, mesenchymalen Stammzellen und Lymphozyten) der Primarius die epitheliale-mesenchymale Transformation (*EMT*) und hierdurch die Bildung von CSCs einleiten (86-89). Eine verbesserte Migration der CSCs innerhalb des Gewebes wird durch das reaktive Stroma bewerkstelligt. Das reaktive Stroma induziert ein inflammatorisches Milieu in der Umgebung. Durch die hieraus erfolgende Freisetzung zahlreicher Proteasen kommt es zur Auflösung enger Zell-Zell Kontakte, sowie zur Degradierung extrazellulärer Matrixkomponenten. (81, 90, 91) Im Verlauf migrieren Tumorzellen so

durch angrenzendes Gewebe, bis sie auf vaskuläre Strukturen treffen und die Intravasation stattfindet.

Intravasation

Unter Intravasation versteht man den Übertritt lokalinvasiver Tumorzellen in Lymph- und/oder Blutgefäße (81). Die Tumorzellen erfahren hierbei eine massive Formveränderung, um die Perizyten und Endothelzellen zu durchdringen (92-94). Vereinfacht wird dieser Vorgang häufig durch bereits geschädigte Endothelstrukturen, welche im neu geschaffenen Gefäßbett des Tumors vorliegen (95). Die nun intravaskulär zirkulierenden Zellen müssen sich nun neuen Herausforderungen stellen, welche im folgenden Unterpunkt beleuchtet werden.

Vaskuläre Zirkulation

Sobald Tumorzellen oder kleine Tumorzellverbände in vaskuläre Strukturen eingetreten sind, stellt die körpereigene Immunantwort die größte Bedrohung dar. Weniger als 0,02% der eingewanderten Zellen überleben die Reise durch das Gefäßsystem (79). Hierbei kann kleinen Tumorzellverbänden eine größere Überlebenschance bescheinigt werden als einzelnen Tumorzellen (96). Um die körpereigene Immunreaktion zu umgehen, bedienen sich die zirkulierenden Zellen einfacher, aber effektiver Mechanismen. Zum einen wird über Oberflächenmoleküle und nachgeschalteter Signalwege eine Phagozytose durch Makrophagen verhindert (97). Zum anderen kann durch die Interaktion der Tumorzellen mit Thrombozyten, Leukozyten und vaskulär endothelialen Strukturen ein „*Immunescape*“ erreicht werden (98-100): Bei Erreichen der distalen Kapillargefäße der Organe beginnen die Tumorzellen mit dem Prozess der Extravasation.

Extravasation

Dem Prozess der Extravasation liegen, ähnlich der Intravasation, sehr komplexe Abläufe zugrunde. Nach erfolgreicher Adhäsion kommt es zur Extravasation und Durchquerung des Endothels von luminal nach extraluminal und letztendlich zur Einnistung in extravaskulärem Gewebe (101).

Zwei Theorien beschreiben diesen Ablauf: Nach der ersten Theorie kommt es aufgrund der Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten luminal (s. Zirkulation) zur Bildung eines größeren Zellkonglomerats, welches im engen Kapillarbett des Organs mechanisch eingefangen wird. Durch die dadurch

entstehende Hypoxie kommt es zur Ausschüttung zahlreicher endothelaktiver Substanzen, die eine Lockerung der engen endothelialen Zell-Zellverbindungen bewirken und so einfache Migrationsprozesse ermöglichen (101-106).

Bei der zweiten Theorie fußt der Prozess der Extravasation auf der *Seed and Soil*-Hypothese nach Paget. Diese besagt, dass für den *Seed*, das heißt die zirkulierenden Tumorzellen, eine spezifische Wachstums Umgebung, der *Soil*, vorhanden sein muss (107, 108). Aktuelle Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass sowohl der Primärtumor, als auch zirkulierende Tumorzellen in der Lage sind über die Ausschüttung spezifischer Mediatoren die spezifischen Anforderungen an eine erfolgreiche Extravasation und Einnistung zu generieren (109-114). In dieser sogenannten prämetastatischen Nische verändert das induzierte reaktive Stroma die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix, sowie die Ausbildung besserer Adhäsionsmöglichkeiten der zirkulierenden Zellen luminal (76, 115, 116).

Ruhezustand oder Kolonisierung

Eine erfolgreiche Extravasation macht noch lange keine erfolgreiche Metastasierung aus. Zunächst ist eine Anpassung an die jeweilige Gewebsumgebung nötig. Diesen Schritt kann eine Großzahl der emigrierten Zellen nicht meistern und aktiviert Apoptoseprogramme, an welchen sie innerhalb der ersten 24 Stunden zugrunde gehen (81). Je nach Tumorart und Mikroumgebung der Zellen kann es bei den verbliebenen Tumorzellen zur Ausbildung einer aktiven Makrometastase, einem ausgeglichenen Zustand zwischen Proliferation und Apoptose oder einem Zellarrest kommen (81).

Um eine aktive Makrometastase bilden zu können, müssen einige Voraussetzungen gegeben sein. Zum einen muss die Mikroumgebung durch Einfluss des Primarius und zirkulierender Tumorzellen an die ausgewanderten Tumorzellen angepasst sein. In der Regel wird auch hier ein inflammatorisches, hypoxisches Milieu geschaffen. Durch diese Triggerfaktoren verändern die Tumorzellen ihren mesenchymalen Charakter. Es findet eine mesenchymale-epitheliale Transformation statt. Durch den epithelialen Zellcharakter werden die Zellen nun vermehrt angeregt zu proliferieren. Es kommt zur Ausbildung einer Makrometastase, welche von sich aus in der Lage ist, neue Metastasen zu bilden (82, 115, 117-121).

Bei nicht ausreichender prämetastatischer Nische, aber erfolgreicher Extravasation tritt der Zustand der Ruhephase bei den Tumorzellen ein. Dieser kann auf zwei Wegen erfolgen. Zum einen kann ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Proliferation und Apoptose bzw. immunologischer Tumorzellzerstörung vorliegen. Diese Form wird Mikrometastase benannt. Zum anderen ist es möglich, dass die Tumorzellen in einem bis zu Jahrzehnten dauernden Zellarrest verharren. Aus beiden Formen ist bei Veränderungen des umliegenden Gewebes eine Umwandlung der „schlafenden“ Mikrometastasen zu einer aktiven Makrometastase möglich. Dies kann entweder durch stattfindende Mutationen geschehen oder durch aktive Wachstumsstimulierung des umgebenden Gewebes (82, 122).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es sich bei der Ausbildung von Metastasen um einen sehr komplexen Prozess handelt. Dennoch kann der Ablauf in fünf Schritten zusammengefasst werden: Lokale Invasion, Intravasation, Zirkulation, Extravasation, Kolonisierung. Das bessere Verständnis des genauen Ablaufes der Metastasierung kann es ermöglichen neue therapeutische Angriffspunkte, wie z.B. in Form von Integrinen als transmembranöse Zell-Adhäsionsrezeptoren, in der bisher vergleichsweise erfolglosen Therapie metastasierten Tumorleidens zu finden.

2.3 Integrine

Der nun folgende Abschnitt soll einen kurzen Überblick über die große Familie der Integrine geben. Integrine gehören zur großen Superfamilie der transmembranären Zell-Adhäsions-Rezeptoren. Sie sind verantwortlich für Zell-Zell, sowie Zell-Extrazellulärmatrix-Interaktionen. Bestehend aus einer α und einer β Untereinheit wird über nicht-kovalente Bindungen ein Heterodimer gebildet. Funktionell sind Integrine unerlässlich für Prozesse der Adhäsion, der Migration, der Proliferation und des zellulären Überlebens (81, 123-125). Die folgenden Unterpunkte gehen genauer auf den Aufbau, die Funktion und die Signalwege ein.

2.3.1 Aufbau und Strukturänderungen

Integrine können der Gruppe 1 der transmembranären Glykoproteine zugeordnet werden (126). Nach fast 30-jähriger Forschung auf dem Gebiet der Integrine sind mittlerweile 24 Integrinrezeptoren bekannt. Sie werden aus 19 α und acht β Untereinheiten gebildet, welche nicht kovalent gebunden sind (Abb. 6) (127, 128).

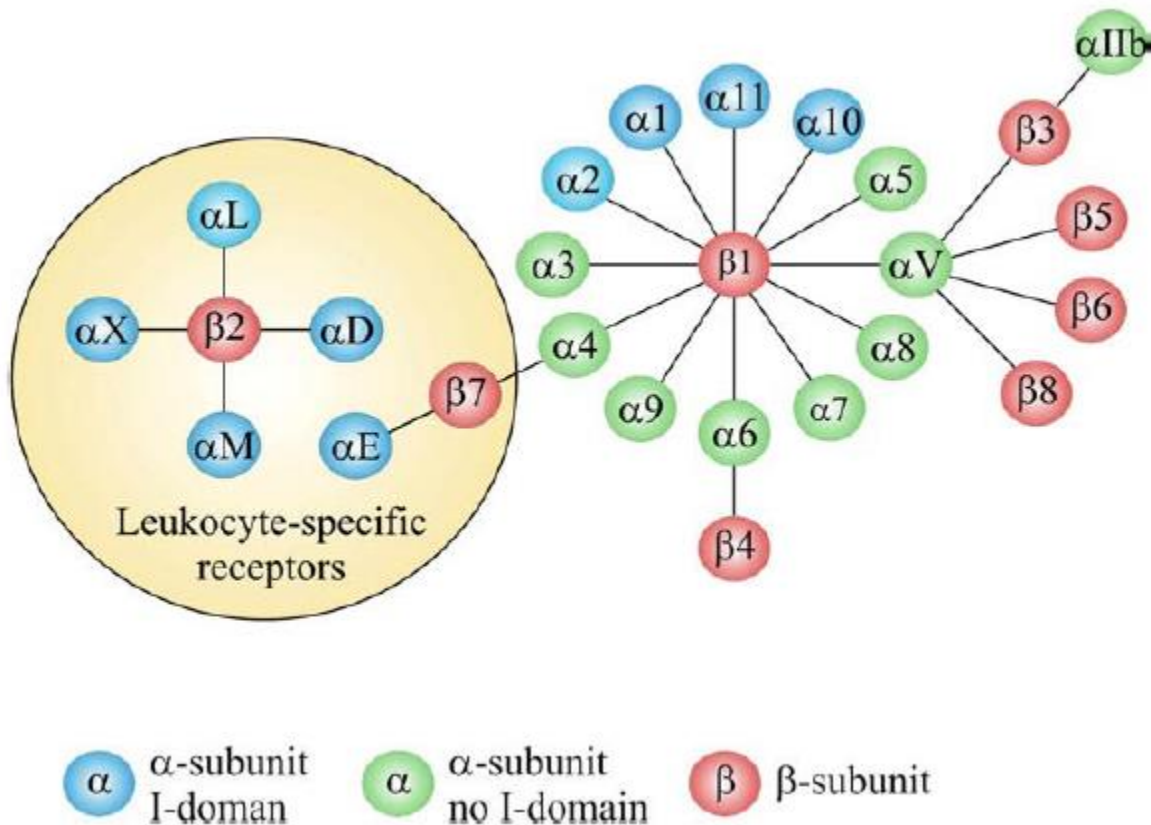


Abb. 6 Die Integrinsuperfamilie, nach Gahmberg, GC (128)

Integrine bestehen aus drei Domänen. Die extrazelluläre Domäne weist den größten Bereich auf. In diesem findet die Bindung von Extrazellulärmatrixkomponenten oder aber der Zell-Zell-Adhäsionskontakt statt. Die α -Untereinheit weist die Struktur eines β -Propellers mit sieben Segmenten auf. In der Hälfte der Integrine ist hierbei zwischen Segment zwei und drei eine I-Domäne (Größe 200 Aminosäuren) eingelagert. Die I-Domäne konnte als Hauptbindungsstelle extrazellulärer Liganden ermittelt werden (126). Bei den anderen Integrinen wird die Ligandenbindungsstelle durch die Interaktion des β -Propellers der α -Untereinheit mit der I-Domäne der β -Untereinheit gebildet (123-125, 129). Die I-Domäne der β -Untereinheit weist einen ähnlichen Aufbau auf wie die der α -Untereinheit. Allerdings sind hierbei zwei Segmente mehr integriert. Eines stellt die Interaktionsstelle mit dem β -Propeller dar, die andere dient der Ligandenbindung (126).

Über den Aufbau und die Funktionen des transmembranen Segments ist bisher wenig bekannt und Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte.

Mit Ausnahme des β_4 -Integrins ist die zyttoplasmatische Domäne mit einer Länge von 50 Aminosäuren vergleichsweise klein. Die α - und β -Untereinheit sind hier nur

schwach zueinander gebunden. Die zytoplasmatische Domäne stellt den Ausgangspunkt für die Generierung intrazellulärer Signalkaskaden bei extrazellulärer Bindung dar und ist verantwortlich für Interaktionen mit dem Zytoskelett. Zum anderen kann der Affinitätsstatus der extrazellulären Domäne über intrazelluläre Regulationsvorgänge verändert werden (126, 129).

Integrine weisen je nach molekularer Form eine veränderte Bindungsaffinität auf. Die gebeugte, niedrige Affinität aufweisende Form muss von einer ausgestreckten, mittleren Affinität aufweisenden Form und einer ausgestreckten Form mit hoher Affinität für extrazelluläre Liganden abgegrenzt werden. Dennoch sind diese Formen nicht als konstant fest anzusehen, sondern liegen in einem Equilibrium vor (126). Durch spezielle intra- oder extrazelluläre Veränderungen kann der aktivierte Zustand überwiegen. Im Folgenden werden die molekularen Veränderungen kurz erläutert.

Werden bestimmte Enzyme, Adapterproteine oder Ionen (Proteinkinase C, G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Talin, Kindlins, Mg^{2+}) an die intrazelluläre, zytoplasmatische Domäne rekrutiert, kommt es zur Separation des α - und des β -Schenkels. Über weitreichende Konformationsänderungen des gesamten Moleküls wird die gebeugte Form ausgestreckt. Dadurch wird die extrazelluläre Bindungsstelle freigelegt und die Affinität gesteigert. Es kommt zu einer Aktivierung des Integrins (130, 131). Dieser Vorgang wird als „*Inside-out signaling*“ bezeichnet.

Beim „*Outside-in signaling*“ wird eine Aktivierung des Integrins von extrazellulär erreicht. Trotz gebeugter Form können extrazelluläre Liganden über die RGD-Sequenz (*Arginin-Glycin-Asparagin-Sequenz*) an die Ligandenbindungsstelle binden (132, 133). Für das Integrin- $\alpha 5\beta 1$ konnten Schuhmacher *et al.* zeigen, dass die Bindung an Fibronectin bereits in einem halb geöffneten Stadium erfolgt. Durch die zusätzliche Rekrutierung von Mg^{2+} kommt es zu einer Bindungsverstärkung an Fibronectin, sowie einer Konformationsänderung des Integrins- $\alpha 5\beta 1$ in einen geöffneten Status (134). Infolgedessen kommt es durch molekulare Veränderungen zu einem Aufschnappen des Moleküls, ähnlich eines Klappmessers. Die komplette Bindungsstelle wird nun offengelegt und eine hoch affine Bindung ist möglich. Durch Bindung eines Liganden kommt es im Verlauf ebenfalls zu einer Separation des α - und des β -Schenkels. Diese setzt sich bis in die zytoplasmatische Domäne fort und sorgt dort durch Anlage von speziellen Adapterproteinen für die Auslösung einer intrazellulären Signalkaskade (128, 129, 135). Diese soll im nächsten Abschnitt näher erläutert werden.

2.3.2 Integrin-Signalkaskaden und deren physiologischen Folgen

Die genaue Interaktion und Aktivierung aller Signale des *outside-in signaling* sind bisher noch nicht zur Gänze verstanden. Deswegen wird im Folgenden ein Überblick über die wichtigsten und bereits etablierten Signalabläufe gegeben. Die Entstehung eines intrazellulären Signals erfolgt auf Basis der Ligandenbindung an der extrazellulären Domäne. Da Integrine selbst keine enzymatische Aktivität besitzen, sind sie auf die Mithilfe zahlreicher Adapterproteine angewiesen. Diese werden bei einer Anhäufung aktiver Integrine an die zytoplasmatische Domäne rekrutiert und bilden zusammen das Adhäsom, ein Multi-Proteinkomplex, der den Ausgangspunkt eines großen Downstreamnetzwerks bildet (136-138). Als wohl wichtigstes Protein ist hierbei die Fokale Adhäsionskinase (FAK) anzusehen, da sie als zentraler Regulator zahlreicher Signalkaskaden eine tragende Rolle einnimmt (139-141). Über die Phosphorylierung und Aktivierung der Tyrosinkinase SRC nimmt FAK über Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges Einfluss auf das Zellüberleben (136, 140). Durch Phosphorylierung von GRB2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) wird der ERK-Signalweg aktiviert, welcher großen Einfluss auf Zellproliferation und Zelldifferenzierung hat. Zellmobilität und -migration werden durch die Aktivierung von P¹³⁰CAS (*p130 Crk-associated substrate*) durch SRC beeinflusst (137, 140, 142). Durch Anlagerung von Integrin linked Kinasen (ILKs) an Integrine wird der PI3K/AKT-Signalweges aktiviert. Dies stellt einen weiteren Einfluss von Integrinen auf das Zellüberleben dar (136). Auch eine FAK-unabhängige Aktivierung von SRC führt über Phosphorylierung von SHC zu einer Aktivitätssteigerung von ERK und einem besserem Zellwachstum (137, 140, 142). Diese oben genannten Signalkaskaden sind in der Regel den meisten Integrinen gemeinsam und scheinen alle durch Anlagerung an die β -Untereinheit des Integrins getriggert zu werden (137). Integrinspezifische Zellveränderungen und Signalkaskaden scheinen hingegen von der α -Untereinheit auszugehen. So konnte gezeigt werden, dass Integrin- α 4 spezifisch Paxillin an die Zellmembran rekrutiert, welches über den DOCK-RAC (*Dedicator of cytokinesis- Ras-related C3 botulinum toxin substrate*)-Signalweg Einfluss auf das Migrationsverhalten von Zellen nehmen kann (128). Auch für das Integrin- α 5 konnte durch Rekrutierung von Caveolin an die Zellmembran die Zellproliferation und das Zellüberleben durch eine weitere Aktivierung des ERK/RAS (*Rat sarcoma*) Signalwegs aufgezeigt werden (137, 140) (Abb. 7).

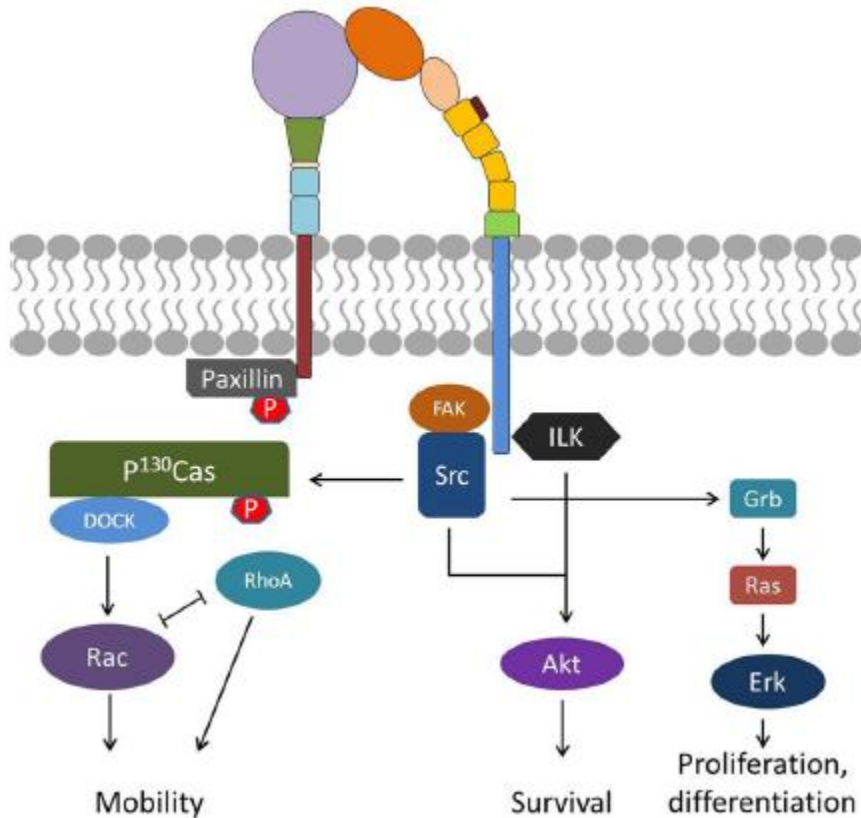


Abb. 7 Graphische Übersicht der wichtigsten Signalwege von Integrinen und ihr Einfluss auf das Zellverhalten

Durch die Anlagerung von FAK und ILK an die β -Untereinheit eines aktiven Integrin kommt es über Aktivierung des AKT, ERK und RAC-Signalweges zu positiver Einflussnahme auf Zellmobilität, Zellüberleben, Zellproliferation und Zelldifferenzierung, verändert nach Hu P und Luo LH (136)

2.4 Bedeutung des Integrins- $\alpha 5$ für die Tumorprogression

Zusammenfassend spielen Integrine in Bezug auf Mobilität, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zellüberleben eine entscheidende Rolle. Integrine nehmen eine wichtige Rolle in den Prozessen der Metastasierung, hierbei vor allem in Prozessen, welche eine erhöhte Zellmobilität erforderlich machen (lokale Invasion, Intra- und Extravasation), ein. Deswegen sind Integrine als Ansatzpunkt neuer Strategien der Tumorthherapie interessant und wurden in zahlreichen Tumorentitäten untersucht (2, 3, 143-147).

In der Untersuchung von Patientenmaterial an Nierentumorpatienten der Universitätsmedizin Mainz zeigte sich eine statistisch signifikant erhöhte Expression von Integrin- $\alpha 5$ im Vergleich zu Normalgewebe der histologischen Subtypen des ccRCC und des pRCC. Des Weiteren konnte eine Erhöhung der Signalmoleküle SHC,

pSHC und ERK im Tumorgewebe aufgezeigt werden. Folglich konnte der Einfluss oben beschriebener Signalmoleküle im Zusammenhang mit Integrinen für das Integrin- $\alpha 5$ belegt werden (148). Ebenso konnten Haber *et al.* einen Zusammenhang zwischen Integrin- $\alpha 5$ und Knochenmetastasen bei Nierenzellkarzinomen aufzeigen (149). Zellen aus Gewebeproben von Patienten mit ossären Metastasen zeigten ein deutlich höheres Migrations- und Adhäsionsbestreben der Zellen gegenüber Fibronektin und Kollagen im Vergleich zu benignen Zellen aus Normalgewebe. In Phosphokinasearrays und Westerblotversuchen zeigte sich ein höheres Expressionslevel von Integrin- $\alpha 5$ in malignen als in benignen Zellen aus Gewebeproben von Patienten. Das erhöhte Migrations- und Adhäsionsverhalten konnte auf eine Beteiligung des PI3K/AKT Signalweges zurückgeführt werden (149). Hase *et al.* zeigten in Exon-array-Untersuchungen eine Regulation von Integrin- $\alpha 5$ durch LOXL2 (*Lysyl oxidase homolog 2*) in renalen Tumorzellen der Zelllinie 786-O auf. Durch Knockdown von LOXL2 kam es auf Basis verminderter Integrin- $\alpha 5$ Expression zu einem verminderten Proliferations-, Migrations- und Invasionsverhalten von Nierentumorzellen der Zelllinie 786-O (150).

Auch in Tumoren anderer Entität wurde die Rolle von Integrin- $\alpha 5$ untersucht. So zeigt sich bei Kolonkarzinomen, dass das Integrin- $\alpha 5$ Einfluss auf den PI3K/AKT-Signalweg und somit die Tumorgenese und maligne Progression hat (1, 143). Murillo *et al.* beschrieben bei Inhibition des Integrin- $\alpha 5$ einen Rückgang der Zelladhäsion und eine Steigerung der Apoptoserate maligner Kolonzellen (1). Des Weiteren besteht ein enger Zusammenhang zwischen Integrinen, P-Selektinen und dem Carcioembryonalen-Antigen (CEA) (151, 152). Auch in Brusttumoren wurde die Rolle des Integrins- $\alpha 5$ untersucht. Brusttumoren weisen eine erhöhte Expression von Integrin- $\alpha 5\beta 1$ auf, welches mit einer schlechteren Prognose einhergeht (4). Es wurde gezeigt, dass es durch Hoch-Regulierung der Matrixmetalloproteasen (MMP) MMP-1 und MMP-2 zu einer erhöhten Invasivität und einem erhöhten Migrationsbestreben kommt (3, 153). Weisen Brustkarzinome erhöhte Level von AKR1B10 (*Aldo-keto reductase family 1 member B10*) und SCR-1 (*Short consensus repeats*) auf, ist dies als prognostisch ungünstig zu bewerten. Huang *et al.*, sowie Quin *et al.* beschrieben als molekulare Ursache der schlechten Prognose eine Beeinflussung des Integrin- $\alpha 5\beta 1$ -Levels durch oben genannte Proteine. Über den FAK/RAC-1/ERK-Signalweg konnte auch hier ein verstärktes Invasions- und Migrationsverhalten der Brustkarzinomzellen aufgezeigt werden (154, 155). Li *et al.* beschrieben einen Zusammenhang zwischen einer

erhöhten Expression von RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*), einem erhöhten Integrin- $\alpha 5\beta 1$ -Level und einer erhöhten Rate an Knochenmetastasierungen (156). Auch bei weiteren gynäkologischen Erkrankungen, wie Ovarialtumoren, konnte eine Beteiligung von Integrin- $\alpha 5\beta 1$ nachgewiesen werden. Hierbei beschrieben Mitra *et al.*, dass es durch die Aktivierung von Integrin- $\alpha 5\beta 1$ zu einer Aktivierung der c-MET/FAK/SRC-Kaskade kommt (2). Im Zuge dessen konnte eine höhere Invasivität des Tumors beschrieben werden. Bei erhöhten Konzentrationen von KLK7 (*Kallikrein-related peptidase 7*) und damit verbundenen erhöhten Leveln an Integrin- $\alpha 5\beta 1$ zeigte sich laut Dong *et al.* eine erhöhte Chemoresistenz von Ovarialtumoren gegenüber Paclitaxel (157). Generell ist auch hier ein erhöhtes Integrin- $\alpha 5\beta 1$ -Level als prognostisch ungünstiger Marker anzusehen (158). Integrin- $\alpha 5\beta 1$ kann auch als negativer Prognosemarker bei Gliomen/Glioblastomen, NSCLC (*non-small cell lung cancer*) und Melanomen herangezogen werden. Bei erhöhtem Integrin- $\alpha 5\beta 1$ -Level tritt ein größeres metastatisches Bestreben der Zellen auf, welches in weiteren Untersuchungen zu einem herabgesetzten Gesamtüberleben führte (145-147, 159, 160).

Das Ziel dieser Arbeit ist die Rolle des Integrins- $\alpha 5\beta 1$ in Bezug auf Adhäsions-, Migrations- und Überlebensprozesse, sowie der zugrunde-liegenden Signalkaskaden bei Nierenzellkarzinomen im Rahmen experimenteller Versuche herauszuarbeiten. Die Expression von Integrin- $\alpha 5\beta 1$ auf verschiedenen Nierenkarzinomzelllinien sollte analysiert werden. Darüber hinaus wurde das Migrationsbestreben auf spezifische Chemotaxine mittels Boydenkammer eruiert. Die zugrundeliegenden Signalkaskaden wurden mittels Westernblot ermittelt.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Kontinuierliche Zelllinien

A-498 (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA):

Bei der Zelllinie A-498 handelt es sich um eine Nierenkarzinomzelllinie epithelialer Morphologie. Sie entstammt einer 52-jährigen weiblichen Patientin und wurde erstmalig durch Giard D.J. *et al.* 1973 beschrieben (161-163).

Caki-1 (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA):

Das Tumorgewebe der Zelllinie Caki-1 wurde aus der Hautmetastase eines 49-jährigen Kaukasiers 1971 gewonnen und kultiviert. Es handelt sich hierbei um ein klarzelliges Nierenzellkarzinom epithelialen Ursprungs (161, 164).

Caki-2 (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA):

Ähnlich der Zelllinie Cak-1 handelt es sich auch bei der Zelllinie Caki-2 um ein klarzelliges Nierenzellkarzinom epithelialen Ursprungs. Aus dem primären Nierenzellkarzinom eines 69-jährigen kaukasischen Mannes gewonnen wurde es ebenfalls 1971 erstmalig kultiviert (161, 164).

CCF-RC 1:

Die Zelllinie CCF-RC-1 wurde 1985 nach Nephrektomie links eines 67-jährigen kaukasischen Mannes in Kultur gewonnen. Zum Zeitpunkt der Operation konnten bereits Knochenmetastasen bei dem Patienten nachgewiesen werden. Hashimura *et al.* gehen auch bei dieser Zelllinie von einem epithelialen Ursprung der Zellen aus (165).

786-O (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA):

Die epitheliale Zelllinie 786-O entstammt dem primären Nierenzellkarzinoms eines 58-jährigen kaukasischen Mannes und wurde 1976 erstmalig beschrieben. Als Besonderheit dieser Zelllinie ist die Expression von PTH (*Parathormon*) like peptide zu erwähnen (164, 166-168).

3.1.2 Gebrauchsgegenstände

BioRad Mini-Protean Tetra System Gelkammer (BioRad, Hercules, USA), Boydenkammer, 48-Well-Mikro-Chemotaxis-Kammer (Costar, Bodenheim), Cell Lifter (Costar, Cambridge), Cell Scraper (Nunc, Roskilde), Gelelektrophoresekammer hergestellt in der Werkstatt der Universitätsmedizin Mainz, Glasküvetten (Glaswerk Weinheim), Halterung für Objektträger (Diapath, München), Laborwecker (VWR), Mini-Protean Comb Gelkamm (BioRad, Hercules, USA), Nalgene Cryo Freezing Container (Nalgene Nunc International, Roskilde, Dänemark), Neubauer-Zählkammer C-Chip (NanoEnTek, Seoul, Südkorea), Pipetten research Eppendorf (0,5-10 µl, 1-100 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl) (Eppendorf, Hamburg), Pipettierhilfe Accu-jet pro (Brand, Wertheim), Westernblotroller (BioRad, Hercules, USA)

3.1.3 Verbrauchsgegenstände

96 Well Cell Culture Plate (Greiner BioOne, Frickenhausen), FilterTips TipOne (Starlab, Ahrensburg) Deckgläser Marienfeld 24x50mm (Marienfeld), Handschuhe (Maimed); Küvetten (Brand), Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden), Millicell®EZ Slides (Merck, Darmstadt) Objektträger mit Mattrand 76x26mm (Diagonal), Parafilm M (Laboratory Film, Chicago); Pasteur-Pipetten 150mm und 230mm (VWR, Darmstadt), Pipettenspitzen mit/ohne Filter 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Starlab), Polycarbonat-Membran 25 x 80 mm, Porengröße 8 µm (Neuro Probe, Gaithersburg, USA), Poly Screen PVDF Transfer Membrane (Perkin Elmer, Waltham, USA), Reacti-Bind Amine-Binding Maleic Anhydride 96-Well Plate (Thermo Scientific, Waltham, USA), Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf, Hamburg), Safe Lock Tubes 1,5ml, 2ml (Eppendorf, Hamburg), Skalpelle, einmal, steril (Braun, Melsungen), Spitzbodenröhrchen (15 ml und 50 ml) (Greiner Bio One, Frickenhausen), Universal-Alufolie, Filterpapier (BioRad, Hercules, USA), Zellkulturflasche 25 cm², 75 cm², 150 cm² (Greiner BioOne, Frickenhausen)

3.1.4 Substanzen

2-Methylbutan (Roth, Karlsruhe), Aceton (AppliChem, Darmstadt), Acrylamide Roti®-phorese Gel 30 (Carl Roth, Karlsruhe), Agarose (Amersham, Biosciences, Freiburg), Ammonium-Persulfat (APS) (Roth, Karlsruhe), Antibody Diluent (Dako, Carpinteria, USA), Aqua ad injectabilia (Braun, Melsungen), Aqua Dest. (Braun, Melsungen), Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma), Coomassie-Färbelösung Roti®-Blue (Roth, Karlsruhe), DAB (3,3'-Diaminobenzidin) (Dako, Carpinteria, USA), Dimethylsulfoxid

3. Material und Methoden

(DMSO) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), DTT (Carl Roth, Karlsruhe), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (Gibco), Ethanol (AppliChem, Darmstadt), Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (Merck, Darmstadt), Fibrinogen (Thermo Scientific, Waltham, USA), Fibronektin (Lyophilisat, steril) (Thermo Scientific, Waltham, USA), Formaldehyd (Sigma, St. Louis, USA), Fetales Kälberserum (FCS, frei von Doxycyclin) (PAA, Pasching, Österreich), Hemacolor-Lösungen 2 und 3 (Merck, Darmstadt), HEPES 1M (Gibco, Carlsbad, USA); Immersionsöl (Merck, Darmstadt), Iscove Basal Medium (Biochrom AG, Berlin), Isopropanol (AppliChem, Darmstadt), Kollagen Typ I lyophilisiert (IBFB, Leipzig), Kollagen Typ IV lyophilisiert (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), Kristallviolett (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), Laminin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Magnesiumchlorid $MgCl_2$ (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), Mayers Hämalaun (Merck, Darmstadt), Methanol reinst (Merck, Darmstadt), Nagellack Express Nailcare (Maybelline Jade, New York), Natriumchlorid NaCl (Carl Roth, Karlsruhe), Natronlauge (AppliChem, Darmstadt), Natriumdodecylsulfat (SDS) (Biorad, Richmond, USA), nonfat dried mild powder (AppliChem, Darmstadt), Paraformaldehyd (Fluka, Chemika, St. Louis, USA) Peroxidase Blocking Solution (Dako, Carpinteria, USA), Phosphatase-Inhibitor (Sigma- Aldrich, St. Louis, USA), Protease-Inhibitor Cocktail (Sigma- Aldrich, St. Louis, USA), Puffertabletten nach Weise (Merck, Darmstadt), Roti®-Block 10x Konzentrat (Roth, Karlsruhe), Roti®-Blot Anodenpuffer (Roth, Karlsruhe), Roti®-Blot Kathodenpuffer (Roth, Karlsruhe), Roti®-Blue (Roth, Karlsruhe), Roti®-Histofix 4,5% (Roth, Karlsruhe), Roti®-phorese 10x SDS-PAGE-Laufpuffer (Roth, Karlsruhe), Roti®-phorese-Gel 30 (30% Acrylamid-Stammlösung) (Roth, Karlsruhe), RPMI + Glutamin (Gibco, Carlsbad, USA), 1680-Medium (Gibco, Carlsbad, USA), Salzsäure (Merck, Darmstadt), Sammelgelpuffer (Bio-Rad, Hercules, USA) Terg-a-zyme (Enzymreiniger) (Sigma), Tetramethylethylendiamin (TEMED) (Sigma- Aldrich, St. Louis, USA), Trenngelpuffer (Bio-Rad, Hercules, USA), Tris (hydroxyl-methyl-aminomethan) (Roth GmbH, Karlsruhe), Tris buffered saline 10 (BioRad, Hercules, USA), Tris(hydroxyl-methyl-amino-methan)-HCl (Merck, Darmstadt), Tris-HCl Buffer 0,5 M pH 6,8 (Biorad, Hercules, USA), Tris-HCl Buffer 1,5 M pH 8,8 (Biorad, Hercules, USA), Triton X-100 (Boehringer, Mannheim), Trypsin-EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Tween 20 (AppliChem, Darmstadt), Vitronektin from human plasma (Lyophilisat, steril) (Sigma, St. Louis, USA), Wash Buffer 10x für Immunzytochemie (Dako, Carpinteria, USA), Western Lightning ECL plus (Perkin Elmer Life Sciences, Waltham, USA), Xylol (Merck, Darmstadt)

3.1.5 Puffer und Lösungen

Anodenpuffer	16 ml Roti®-block A 10x 32 ml Ethanol 84 ml dH ₂ O
Blockpuffer	1x PBS 0,5% BSA
Kathodenpuffer	16 ml Roti®-block K 10x 32 ml Ethanol 84 ml dH ₂ O
Kristallviolett 0,5%	0,25 g Kristallviolett 50 ml Ethanol 2%
Lysepuffer	500 µl 10x Puffer C 50 µl DTT 50 µl Protease Inhibitor Cocktail 50 µl Phosphatase Inhibitor 4350 µl dH ₂ O
10x Puffer C	20 nM HEPES 0,2 M NaCl 0,5 mM MgCl ₂ 0,4 mM EDTA 1% Triton-X 100
Puffer nach Weise	1 Tablette in 1l dH ₂ O
Sammelgel 4% für 2 Gele	3,4 ml dH ₂ O 0,83 ml Acrylamid 30% 0,63 ml Sammelgelpuffer 50 µl 10% SDS 50 µl APS 5 µl TEMED
SDS-Laufpuffer	100 ml 100x SDS-Laufpuffer 900 ml dH ₂ O
10x TBS	26 g Tris- HCl 4,24 g Tris 292,7 g NaCl ad 1 l dH ₂ O

3. Material und Methoden

1x TBST	100 ml 10x TBS 900 ml dH ₂ O 1 ml Tween20
Trenngel 7,5% für 2 Gele	5,3 ml dH ₂ O 2,5 ml Acrylamid 30% 2,6 ml Trenngelpuffer 100 µl 10% SDS 100 µl APS 4 µl TEMED
Trenngel 10% für 2 Gele	3,8 ml dH ₂ O 3,4 ml Acrylamid 30% 2,6 ml Trenngelpuffer 100 µl 10% SDS 100 µl APS 4 µl TEMED
Waschpuffer	1x PBS 0,05% Tween20

3.1.6 Kits

BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo Scientific, Waltham, USA)

CellTox™ Green Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, USA)

CellTiter-Glo® Viability Assay (Promega, Madison, USA)

DAKO EnVision Flex® Minikit K5023 (Agilent DAKO, Santa Clara, USA)

3.1.7 Antikörper

3.1.7.1 Primärantikörper

AKT Antibody, polyclonal, rabbit (Cell Signaling, Danvers, USA), β-Actin Antibody, monoclonal, mouse, Erk 1/2 Antibody, polyclonal, rabbit (R&D Systems, Abingdon, UK), FAK Antibody, polyclonal, rabbit (Millipore, Temecula, USA), Phospho-AKT (Ser473) Antibody, monoclonal, rabbit (Cell Signaling, Danvers, USA), Phospho-AKT (Thr308) Antibody, monoclonal, rabbit (Cell Signaling, Danvers, USA), Phospho-Erk 1/2 (Thr202/Tyr204, Tyr185/Tyr187) Antibody, monoclonal, rabbit (R&D Systems,

Abingdon, UK), Phospho-FAK (Tyr397) Antibody, polyclonal, rabbit (Cell Signaling, Danvers, USA), Phospho-SHC (Tyr239/240) Antibody, polyclonal, rabbit (Cell Signaling, Danvers, USA), SHC Antibody, polyclonal, rabbit (Cell Signaling, Danvers, USA), Anti-HLA Class1 ABC antibody [EMR 8-5], monoclonal, mouse, ab 70328 (abcam, Cambridge, UK), Anti-Integrin- α 5-antibody [P1D6], monoclonal, mouse, ab 78614 (abcam, Cambridge, UK), Mouse IgG3, monoclonal [PPV-07]-Isotype, Control ab91537 (abcam, Cambridge, UK).

Die Westernblot-Antikörper wurden je nach Angaben des Herstellers in 2% Milchpulver TBST, 5% BSA TBST oder in 1x Roti®-block in einer Verdünnung von 1:1000 angesetzt.

3.1.7.2 Sekundärantikörper

Donkey anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz, Santa Cruz, USA)

Goat Anti-Rabbit IgG/HRP (Dako, Glostrup, Dänemark)

Rabbit anti-Mouse IgG/HRP (Dako, Glostrup, Dänemark)

3.1.8 Größen- und Molekularstandards

BenchMark Prestained Protein Ladder (Invitrogen, Karlsruhe), Magic Mark XP (Invitrogen, Karlsruhe)

3.1.9 Geräte

Absaughilfe Vacuboy (IBS Integra Biosciences, Fernwald), Blotting-Apparatur Trans Blot Turbo (BioRad, Hercules, USA), CO₂-Inkubator Hera Cell 240 (Heraeus, Hanau), Dampfsterilisator Varioklav (H+P Labortechnik, Oberschleißheim), Eppendorf-Tischzentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg), Fluorchem E (Protein simple, Santa Clara, USA), Eismaschine (Ziegra, Isernhagen), Durchflusszytometer FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, USA), Gefrierschrank -20°C (Bosch, Gerlingen), Gefrierschrank -80°C (Nalgen Nunc Int, Penfield, USA), Gelelektrophoresekammer hergestellt in der Werkstatt der Universitätsmedizin Mainz, GloMax®-Multi+ (Promega, Madison, USA), GyroTwister- Schüttler IKA (Labonet Int., Wien, Österreich), Heißluftsterilisator Heraeus Oven (Thermo Scientific, Waltham, USA), Heiz-/Magnetrührer (IKA Labortechnik, Stauffen), Heizblock Dri-Block-3 (Techne, Stone, UK), Heizblock Eppendorf Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg), Hera Cell 240 Inkubator (Thermo Scientific, Waltham, USA), Inkubationsschüttler VSR 23 (Grant

Boekel, Cambridge, UK), Kryo-Stickstofftank Locator 6 Plus (Thermo Scientific Waltham, USA), Kühlschranks 4°C Cooler (Bosch, Gerlingen), Labor-Feinwaage (Sartorius, Göttingen), Laborwaage (Sartorius, Göttingen), Megafuge 1.0 R Heraeus (Thermo Scientific, Waltham, USA), Mikro-Kühlzentrifuge 202 MK (Sigma, Osterode), Mikroskop Axioskop 40 (Zeiss, Oberkochen), Mikroskopkamera AxioCam MRc5 (Zeiss, Oberkochen), Mini-Vac Power Pumpe (PeqLab, Erlangen), Power Supply PP2000 (Biometra, Göttingen), Rollenmischer RS-TR 5 (Phoenix Instruments, Garbsen), Sicherheitswerkbank Hera Safe Heraeus (Thermo Scientific, Waltham, USA), Tischzentrifuge 3722L (Thermo Scientific, Waltham, USA), Ultraschallbad Sonorex Super RK510 (Bandelin electronic, Berlin), Vortex VF2 (IKA, Staufen), Wasserbad Aqualine AL18 (Lauda, Lauda-Königshofen), Zentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg), Zentrifuge MegaFuge 1.0R (Heraeus, Hanau), Zytospin-Zentrifuge 1200 (Hettich Universal),

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturarbeiten

Auftauen von Zellen

Nach 2-5minütiger Inkubation im 37°C Wasserbad wurden die Zellen unter die sterile Werkbank verbracht. Dort wurde die Zellsuspension mit 2 ml Vollmedium (Basalmedium mit spezifischen Zusätzen, Tab. 5) suspendiert und in ein 15 ml Reaktionsgefäß transferiert. Die Zellsuspension wurde im nächsten Schritt für 5 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert bzw. abgesaugt. Nach anschließender Resuspension mit Vollmedium wurde die Zellsuspension in eine Zellkulturflasche überführt, mit Medium aufgefüllt und die Flasche in den Inkubator verbracht.

Arbeiten mit Zellen

Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um humane Nierenkarzinomzellen. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und angefeuchteter Atmosphäre (Luftfeuchtigkeit 90%) in einem Inkubator kultiviert. Es wurde unter einer sterilen Werkbank gearbeitet. Alle verwendeten Materialien und Lösungen wurden entweder steril geliefert oder vor Gebrauch autoklaviert, die Lösungen vor ihrem Gebrauch auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

Kultivierung und Passagieren von Primärzellen

Die Versorgung der kontinuierlichen Zelllinien erfolgte mit unterschiedlichen, den jeweiligen Bedingungen angepassten Basalmedien und entsprechenden Zusätzen (Tab. 5).

Tab. 5 Übersicht über die Zusammensetzung und Verwendung von Basalmedien spezifischer Zelllinien

Zellreihe	Basalmedium	Zusätze
786-O	RPMI 1640 Medium (X1X)	10% FCS, 2,5% HEPES, 1% P/S
A-498		
RC-1		
CAKI-1	Iscoves Basal Medium	10% FCS, 1% P/S, 1%GlutaMax
CAKI-2		

Um eine stetige Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu gewährleisten, wurde alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt. Hierbei wurde das verbrauchte Nährmedium mittels eines Saugers abgesaugt, der Zellrasen mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend neues Nährmedium auf den Zellrasen gegeben. Eine Übersicht über die verwendeten Volumina je nach Zellkulturflasche gibt Tab. 6.

Tab. 6 Daten und Verbrauch bestimmter Zellkulturflaschen

Zellkulturfläche	Volumen an Vollmedium	Menge an Trypsin
T- 25 = 25 cm ²	5 ml	0,5 ml
T- 75 = 75 cm ²	15 ml	1,0 ml
T- 175 = 175 cm ²	25 ml	2,0 ml

Wenn sich nach einigen Tagen ein konfluenter Zellrasen gebildet hatte, wurde die Zellkultur passagiert. Hierzu wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen anschließend mit DPBS (*Dulbecco's phosphate buffered saline*) gewaschen. Um die Zellen von ihrer Unterfläche zu lösen und die Zell-Zell-Verbindungen aufzutrennen, wurde eine nach Kulturflasche definierte Menge Trypsin/EDTA (*Ethylendiamintetraacetat*) auf die Zellen gegeben und für 2-5 Minuten inkubiert (Tab. 6). Nach leichtem Klopfen gegen die Kulturflasche wurde eine Sichtkontrolle unter dem Lichtmikroskop durchgeführt, um die Loslösung aller Zellen zu verifizieren. Im Anschluss wurde die Trypsinwirkung durch die Zugabe von Vollmedium abgestoppt. Das in dem Vollmedium enthaltene FCS (*fetales Kälberserum*) stoppt die enzymatische Wirkung von Trypsin durch kompetitive Inhibition. Die nun vorliegende Zellsuspension wurde in einem gewünschten Verhältnis aufgeteilt und der Überstand verworfen. Zum Abschluss wurde die Kulturflasche mit Vollmedium aufgefüllt und die Zellen weiter kultiviert. Nach drei bis vier Passagen wurden die Zellen in eine neue Kulturflasche überführt und dort weiter kultiviert.

Kryokonservierung von Zellen

Um nicht genutzte oder überschüssige Zellen nicht verwerfen zu müssen, wurden diese in einem Flüssigstickstofftank kryokonserviert. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit Trypsin gelöst und anschließend in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 1200 U/min und Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in einer 10% DMSO-Medium (*Dimethylsulfoxide*)-Lösung resuspendiert, bis sich eine gleichmäßige Suspension gebildet hatte. Ein Milliliter Zellsuspension wurde pro Kryoröhrchen verwendet. Bei einem stark konfluierenden Zellrasen wurde die Zellsuspension auf drei Kryoröhrchen aufgeteilt. Nach Beschriftung des Röhrchens mit Datum, Passage und Zelllinie wurden die Röhrchen auf Isopropylalkohol bei -80°C über Nacht eingefroren. Ab dem nächsten Tag wurden die Röhrchen in einen Flüssigstickstofftank überführt.

3.2.2 Zellzählung in Neubauerkammer

Zur Auszählung von Zellen wurde eine vorgefertigte modifizierte Zählkammer nach Neubauer verwendet (C-Chip der Firma NanoEnTek). Es wurden 15 µl Zellsuspension auf die Zählkammer pipettiert. Anschließend wurden lichtmikroskopisch bei 10facher Vergrößerung alle vier Quadranten ausgezählt, wobei Zellen, die sich direkt auf der Grenzlinie befinden nur an zuvor festgelegten Grenzlinien berücksichtigt wurden. Um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten, wurde die gezählte Zahl durch vier dividiert und mit 10^4 multipliziert. Im abschließenden Schritt wurde mittels Dreisatzes das gewünschte Zellvolumen ermittelt.

3.2.3 FACS

Das Fluorescens-activated cell sorting (FACS) dient der Detektion und Quantifizierung bestimmter Oberflächenmoleküle auf Zellen. Ein Messsignal wird durch die Anregung von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern durch einen Laserstrahl generiert. Die Intensität und das Vorliegen eines Fluoreszenzsignals lassen auf das Vorhandensein der nachzuweisenden Zellart bzw. Oberflächenmoleküle schließen. Das gesamte Vorgehen wurde für jede Zelllinie angewendet.

Zunächst wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen mit Trypsin aus dem Zellverband gelöst und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 1200 U/min wurde der Überstand abgesaugt und das am Boden liegende Zellpellet in 10 ml DPBS gelöst. Nach anschließender Zentrifugation für 5 Minuten bei 1200 U/min wurde dieser Schritt wiederholt. Das Volumen für eine Zellzahl von $0,5 \times 10^6$ Zellen wurde ermittelt (s. 2.2.2), in jeweils drei FACS-Röhrchen transferiert und für 5 Minuten bei 1200 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 100 µl DPBS + 1% BSA (*Bovine Serum Albumin*) unter Resuspension gelöst. Die drei Zellsuspensionen bilden die drei Versuchsproben ab.: eine unbehandelte Kontrolle, eine Isotypenkontrolle und eine Anti-Integrin- $\alpha 5$ -Antikörper behandelte Versuchsprobe. Die hierbei verwendeten Antikörper waren PPV-07 Antikörper der Firma abcam, ein Maus IgG3 monoklonaler Antikörper (ab91537) für die Isotypenkontrolle, sowie P1D6 Antikörper als Integrin- $\alpha 5$ -Antikörper (ab 70328, abcam). Während die drei Zellsuspensionsansätze in der Zentrifuge bei 1200 U/min für 5 Minuten bearbeitet wurden, wurden die Antikörperverdünnungen angesetzt. Für die Isotypenkontrolle wurden 10 µl PPV-07 Antikörper in 100 µl DPBS +1% BSA gelöst. In der Anti-Integrin- $\alpha 5$ -Probe wurde eine Antikörperkonzentration von 1 µl pro 100 µl

DPBS + 1% BSA P1D6 Antikörper verwendet. Pro Ansatz wurden jeweils 100 µl Antikörperlösung mit 100µl Zellsuspension vermengt, gevortext und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Durch das Auffüllen der Probe mit unsterilem DPBS und anschließender Zentrifugation (1200 U/min; 5 Minuten) wurde die Probe gewaschen. Der Überstand mit überschüssigem und nicht gebundenem Antikörper wurde abgekippt. 100µl des Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 rabbit anti-mouse IgG (H+L) der Firma lifetechnologies (1 µl je Ansatz auf 100 µl Färbelösung mit DPBS + 1% BSA) wurden zugegeben, kurz gevortext und für 30min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Durch das Auffüllen mit unsterilem DPBS und darauffolgender Zentrifugation (1200 U/min, 5 Minuten) wurde überschüssiger Antikörper abgewaschen. Der Überstand wurde abgekippt und das Zellpellet für den Messvorgang in 500 µl DPBS + 1% BSA suspendiert. Der Messvorgang wurde mit einem FACS-Gerät durchgeführt. Das Ergebnis wurde durch 15000 Counts pro Versuchsreihe im FACS-Gerät ermittelt und ausgewertet.

Insgesamt wurden fünf Zelllinien von humanen Nierenzellkarzinomen auf ihre Integrin- $\alpha 5$ Expression hin untersucht. Dies waren die Zelllinien RC-1, Caki-1, Caki-2, A-498 und 786-O. Der ermittelte *Mean-value* gibt hierbei den Mittelwert der Intensität der Messung wieder. Der relative Mittelwert wurde durch die Differenz der Mittelwerte der Intensität der Isotypenkontrolle und der durch Antikörper markierten Messung ermittelt. Mit Hilfe der Isotypenkontrolle werden Hintergrund- und Störsignale erfasst.

3.2.4 Migrationsversuch in Boydenkammer

Für das Migrationsverhalten von Zellen auf bestimmte chemotaktische Komponenten der Extrazellulärmatrix wurde eine modifizierte Boydenkammer verwendet (Abb. 8). Die auf eine Membran migrierten Zellen wurden anschließend angefärbt und ausgezählt.

Versuchsdurchführung mittels Boydenkammer

Die Möglichkeit von Zellen durch Membranen und andere Gewebe zu wandern bezeichnet man als Migration. Dieses auch *in vivo* vorkommende Phänomen kann bei *in vitro* Versuchen mithilfe einer modifizierten Boydenkammer nachgestellt werden. Eine Boydenkammer besteht aus zwei Kompartimenten, welche durch eine semipermeable, poröse Polycarbonatmembran getrennt sind. Durch die in dem

unteren Kompartiment angereicherten Chemotaxine werden Zellen dazu angeregt in diese Richtung zu wandern. Aufgrund der Porengröße der Polycarbonatmembran von 8 µm werden die Zellen zu einer aktiven Migrationsbewegung gezwungen (Abb. 8). Durch Anfärbung der Membran kann am Ende die Zahl an migrierten Zellen ausgezählt werden.

Nachdem die Zellkultur am Vortag auf serumfreies Medium gesetzt wurde, wurde die Zellzahl auf 3×10^5 eingestellt und sehr gut suspendiert, um eine Einzelzelllösung zu gewinnen und das Vorhandensein von Zellklumpen zu vermeiden. Die jeweilige Zellsuspension wurde nun für 30 Minuten mit den Primärantikörpern P1D6 bzw. EMR-8-5 als Isotypenkontrolle in einer Konzentration von 10 µg/ml inkubiert. Als weitere Versuchsreihe wurde eine Versuchsgruppe mit P1D6 20 µg/ml für 30 Minuten inkubiert. In den unteren Teil der Kammer wurden jeweils 29 µl des Lockstoffes pipettiert. Hierzu wurden die Extrazellulärmatrixkomponenten Fibronektin und Fibrinogen verwendet. Fibrinogen konnte in einer Konzentration von 10 µg/ml bereits in Vorarbeiten als potentes Chemotaxin etabliert werden (169). Die Polycarbonatmembran wurde mit der glänzenden Seite nach unten in PBS eingelegt und für 2-3 Minuten gewaschen. Daran anknüpfend wurde die Membran mit der glänzenden Seite nach unten der unteren Platte aufgelegt und durch den Dichtungsring, sowie das Anschrauben der oberen Platte fixiert. 50 µl Zellsuspension wurden nun möglichst luftblasenfrei in die oberen Wells gegeben. Anschließend wurde die gesamte Kammer für 16 Stunden im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und angefeuchteter Atmosphäre inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kammer auseinandergelöst und die Membran gewonnen. Nach Waschen in Puffer von Weise und Abziehen der matten Seite an einem Küchenschaber, um die nicht migrierten Zellen zu entfernen, wurden die auf die glänzende Seite migrierten Zellen in Ethanol fixiert. Die anschließende Färbung mit Hemacolor 2 und 3 der Firma Merck gab Aufschluss über die Anzahl der migrierten Zellen. Hierzu wurden die Zellen zunächst dreimal in roter und sechsmal in blauer Färbelösung gefärbt. In Puffer von Weise wurde anschließend die überschüssige Farbe abgewaschen. Um die Zellzahl zu ermitteln, wurde die Membran auf einen Objektträger überführt. Nach Glattstreichen mit Puffer von Weise und Verteilung von Immersionsöl wurde die Membran durch ein Deckglas fixiert, welches mit Nagellack verklebt wurde. Im Lichtmikroskop wurde die Membran ausgewertet. Es wurde ein Rasterokulars verwendet, mit welchem zehn komplette Raster pro Well ausgezählt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer

Exceltabelle. Zur Reinigung wurden die Kammern über Nacht in Terg-a-Zyme eingelegt.

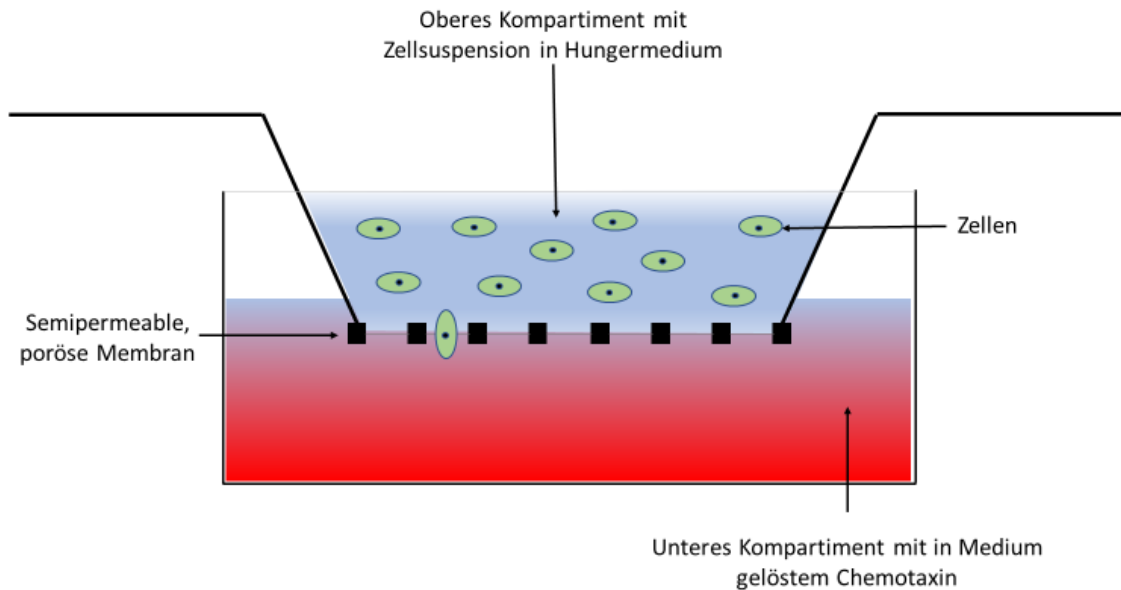


Abb. 8 Schematische Darstellung des Aufbaus einer modifizierten Boydenkammer für den Migrationsversuch

Die in serumfreiem Medium gelösten Zellen durchwandern entsprechend des Chemotaxingradienten aktiv die semipermeable, poröse Membran mit Porengröße von 8 μm und bleiben an der Unterseite der Membran haften. Dort können sie mittels Kristallviolett färbung und mikroskopischer Darstellung quantitativ ausgewertet werden.

3.2.5 Zelladhäsionsversuch

Nierenkarzinomzellen besitzen die Fähigkeit an bestimmte Komponenten der Extrazellulärmatrix zu binden. Um diese Fähigkeit aufzuzeigen und die daran beteiligte Rolle des Integrins- $\alpha 5$ zu veranschaulichen, wurde ein Adhäsionsversuch durchgeführt. Hierfür wurden speziellen 96-Well Platten verwendet (*Amine binding, maleic anhydride activated clear 96-Well-plates; Pierce*). Diese Platten besitzen die Fähigkeit Komponenten der Extrazellulärmatrix auf ihrer Oberfläche zu binden. Untersucht wurde das Bindungsverhalten an folgenden Extrazellulärmatrixkomponenten (Tab. 7). BSA wurde hierbei als Negativkontrolle verwendet.

Tab. 7 Extrazellulärmatrrixkomponenten und ihre Konzentration

Laminin	50 µg/ml
Fibronektin	10 µg/ml
Kollagen IV	10 µg/ml
Fibrinogen	10 µg/ml–2 mg/ml
BSA	10 µg/ml

Zur Beschichtung wurden die Wells mit 100 µl/Well der jeweiligen Komponente in vierfach Ansätzen über Nacht auf einem Inkubationsschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Platten mit 100 µl/Well Waschpuffer (DPBS + 0,05% Tween 20) wurden unspezifische Bindungsstellen mit 20 µl/Well Blockpuffer (DPBS+ 5% BSA) blockiert und eine Stunde im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und angefeuchteter Atmosphäre inkubiert. In dieser Zeit wurden die Zellen aus den Zellkulturflaschen in Suspension gebracht und in einer Konzentration von 4x10⁵ Zellen/ml in serumfreiem Medium suspendiert. Diese Zellsuspension wurde für 30 Minuten mit den Primärantikörpern P1D6 bzw. EMR-8-5 in einer Konzentration von 10 µg/ml inkubiert. Nach Überführung von 50 µl Zellsuspension pro Well wurden die Zellen für eine weitere Stunde im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und angefeuchteter Atmosphäre inkubiert, um zu adhären. Nicht adhären Zellen wurden nun durch zweimaliges Waschen mit 100 µl/Well Waschpuffer abgewaschen. Die adhären Zellen wurden durch 100 µl/Well 4% Paraformaldehydlösung für 15 Minuten auf der Platte fixiert. Überschüssiges Paraformaldehyd wurde abgegossen und anschließend mit 100 µl/Well DPBS die Platte abgewaschen. Die adhären Zellen wurden nun mithilfe einer Kristallviolettlösung (5 mg/ml in 2% Ethanol) für 10 Minuten angefärbt. Nach Entfernen des überschüssigen Färbemittels durch dreimaliges Waschen mit 100 µl/Well Waschpuffer, wurden die Platten zum Trocknen auf einem Tuch ausgelegt. Um die relative Menge an adhären Zellen im einem ELISA-Reader (*Enzyme-linked Immunosorbent assay*) zu analysieren, wurde der Farbstoff durch 100 µl 2%iger SDS-Lösung in H₂O durch 30-minütige Inkubation auf einem Inkubationsschüttler herausgelöst. Die Menge an gelöstem Farbstoff wurde zuletzt in einem ELISA-Reader durch Absorption bei 550 nm (Referenzwellenlänge 650 nm) photometrisch bestimmt.

Um den Effekt des Integrins- $\alpha 5$ auf das Adhäsionsverhalten von Nierenkarzinomzellen zu untersuchen, wurde dieses durch einen spezifischen monoklonalen Antikörper (P1D6, abcam) gehemmt und die Adhäsionsreduktion im Vergleich zu einer unbehandelten Positivkontrolle ermittelt.

3.2.6 Immunzytochemie

Durch immunzytochemische Färbetechniken wurde die Verteilung und das Auftreten von Integrin- $\alpha 5\beta 1$ auf der Zelloberfläche analysiert. Hierbei wurde das Integrin- $\alpha 5$ mittels eines Anti-Integrin- $\alpha 5$ -Primärantikörpers (P1D6 1:200 verdünnt, 30 Minuten Inkubation) markiert und mittels an Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpers mithilfe des EnvisionFlex/HRP Färbekits von Dako separat visuell dargestellt. Anschließend erfolgte eine generelle Zellfärbung mittels Mayers-Hämalaunfärbung.

3.2.6.1 Zytospin

Ziel des Zytospins ist die Fixierung von Zellen auf einem gekammerten Objektträger (Millicell®EZ Slides), um diese dort nach immunzytochemischen Verfahren anzufärben und unter einem Lichtmikroskop zu analysieren.

Zunächst wurden die Zellen der Kultur in Lösung gebracht, abzentrifugiert und gewaschen. Die gewünschte Zellzahl ($1,5 \times 10^5$ Zellen/3 ml) wurde nun eingestellt, gut resuspendiert und mit DPBS auf ein Zielvolumen von 3 ml verdünnt. Nach Zusammensetzen der Zentrifugenkomponenten und des Objektträgers wurde jede Objektträgerkammer mit 1 ml aufgefüllt. Durch 10-minütige Zentrifugation bei 3600 U/min wurden die Zellen auf den Objektträger transferiert und anschließend die Zentrifugeneinsätze über Nacht auf dem Kopf stehend getrocknet. Am nächsten Tag konnten die Objektträger entweder immunzytochemisch gefärbt oder bei -20°C zur Lagerung eingefroren werden.

3.2.6.2 Immunzytochemische Färbung

Zur immunzytochemischen Färbung wurde das Färbekit EnvisionFlex/HRP von Dako verwendet (DAKO EnvisionFlex® Minikit K5023). Zur Fixation auf dem Objektträger wurden die Zellen für 10 Minuten mit 100% Ethanol behandelt, welches anschließend durch zweimaliges Waschen mit H_2O entfernt wurde. Um die endogene Peroxidase der Zellen zu blockieren, wurde der Objektträger für 10 Minuten mit *Peroxidase Blocking Solution* inkubiert und zweimalig mit Aqua dest. abgewaschen. Für die Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Objektträger zunächst in die

Färberacks eingesetzt. Um die richtige Position des Objektträgers in dem Rack zu prüfen, wurde dieses mit Waschpuffer gespült und das Abflussverhalten beobachtet (Waschpuffer muss langsam durchlaufen). Anschließend erfolgte die einstündige Inkubation des in *Antibody diluent* gelösten Primärantikörpers (1:200) mit einem Volumen von 1 ml. Nach dreimaligem Abwaschen des Primärantikörpers mit Waschpuffer wurden 100 µl *Visualisation Reagent* zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. Nach dem Waschen erfolgte nun die Diaminobenzidin (DAB) Färbung. 100 µl DAB-Reagenz bestehend aus 1 ml DAB-*Substrate buffer* und zwei Tropfen DAB-*Chromogen* wurden für 5 Minuten auf dem Objektträger inkubiert. Anschließend wurde eine Mayers-Hämalaun Färbung durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen mit Aqua dest. wurden die Objektträger aus den Racks entfernt, in Küvetten überführt und 1 Minute mit Mayers-Hämalaun angefärbt. Nach einem weiteren Waschschritt wurde die Färbung in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 2 Minuten fixiert. Nach 3-maligem Waschen in Xylol für 5 Minuten wurde der Objektträger mit Entellan eingedeckt und über Nacht getrocknet. Die Auswertung der Objektträger erfolgte unter einem Lichtmikroskop bei 10- und 20facher Vergrößerung.

3.2.7 Westernblot

Durch Westernblotverfahren werden Proteine anhand ihrer Größe in einem elektrischen Feld über eine SDS-Gelelektrophorese (*Sodium Dodecylsulfate*) aufgetrennt. Die Eigenladung der Proteine wird hierbei durch Zugabe von SDS überdeckt. Nach anschließendem Blotting auf eine PVDF-Membran (*Polyvinyliden-fluorid*) können spezifische Proteine mittels Primär-Sekundärantikörperverfahren gefärbt und mit gekoppelter Chemofluoreszenzreaktion detektiert werden.

2.2.7.1 Proteinextraktion

Ziel des Versuchs ist die Gewinnung von Proteinextrakten aus einer Zellkulturschale mittels mechanischer Einwirkung und Aufschließung zellulärer Proteine durch einen Lysepuffer. Im ersten Schritt wurden Zellen aus einer Zellkulturflasche auf einer Kulturschale kultiviert und am Tag vor der Versuchsdurchführung auf serumfreies Medium umgestellt. Im zweiten Schritt wurde der Lysepuffer angesetzt. Alle Arbeiten in diesem Versuch wurden auf Eis durchgeführt, soweit nicht anders angemerkt. Nach Waschen der Zellen mit DPBS wurde Lysepuffer auf die Zellkultur gegeben. Nun wurde der Zellrasen mittels eines Zellschabers in den Lysepuffer abgeschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt und kurz gevortext. Nach 30-minütiger Inkubation wurde das

Zelllysate für 10 Minuten bei 14000 U/min und 4°C abzentrifugiert, um Zellbestandteile von den sich in Lösung befindenden Proteinen zu trennen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die so gewonnenen Proteinextrakte konnten bei -20°C gelagert werden. Insgesamt wurden drei Proteinextrakte je Behandlungsgruppe gewonnen; eine unbehandelte Kontrolle, eine mit Fibronectin stimulierte Positivgruppe, sowie eine mit P1D6-Antikörpern und Fibronectin behandelte Versuchsreihe. Die Inkubation mit Fibronectin 10 µg/ml erfolgte für 30 Minuten vor Gewinnung der Proteinlysate für die Positivgruppe. Die Versuchsreihe wurde zunächst für 30 Minuten mit Anti-Integrin- α 5-Antikörpern 10 µg/ml und anschließend für 30 Minuten Fibronectin 10 µg/ml inkubiert und anschließend die Proteinlysate gewonnen.

2.2.7.2 Proteinbestimmung und Acetonfällung

Mithilfe einer Verdünnungsreihe wurden die Proteinkonzentrationen der entsprechenden Proteinextrakte ermittelt. Anschließend konnte die gewünschte Menge an Protein (hier 100 µg) entnommen und mithilfe von Aceton gefällt werden.

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mithilfe des BCA-Kits (*Bichinoninsäure*) von Thermo Scientific®. Hierbei wurden zweiwertigen Kupferionen abhängig von der Proteinkonzentration zu einwertigen Kupferionen reduziert. In Anwesenheit von BCA ergibt sich eine Violettfärbung der Lösung, welche durch photometrische Absorptionsmessung quantifiziert werden kann. Um statistische Genauigkeit zu gewährleisten, wurden Dreifachansätze verwendet. Im Anschluss wurde die Menge an Proteinlösung für 100 µg Protein entnommen und durch Zugabe von Aceton ausgefällt. Als Standardreihe wurden folgende Lösungen laut Anleitung des Kits angesetzt (Tab. 8).

Die Proteinextrakte wurden im Verhältnis 1:5 mit Aqua dest. auf ein Endvolumen von 75 µl in einem neuen Reaktionsgefäß verdünnt. Ebenso wurden je 75 µl der Standardreihe in ein beschriftetes Reaktionsgefäß überführt. Nach Herstellung der BCA-Reaktionslösung durch Mischen der Kit-Lösungen A und B im Verhältnis 50:1 wurden 600 µl der Reaktionslösung in schneller Abfolge in die Reaktionsgefäße pipettiert. Anschließend wurden je 200 µl/Well der Lösungen auf eine 96-Well Platte transferiert. Es wurden Dreifachansätze durchgeführt. Nach 30minütiger Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre wurde die Absorption bei 562nm gemessen und die Proteinmenge mittels einer BSA-Eichkurve ermittelt.

Tab. 8 Standardreihe des BSA-Kits von Thermo Scientific

	H ₂ O [μ l]	BSA [μ l]	Konzentration [μ g/ml]
A	0	500	2000
B	208,5	625	1500
C	541,5	541,5	1000
D	291,5	291,5 aus B	750
E	541,5	541,5 aus C	500
F	541,5	541,5 aus E	250
G	541,5	541,5 aus F	125
H	666,5	166,5 aus G	25
I	666,5	0	Blank

Zur Fällung von 100 μ g Protein wurde das oben ermittelte Volumen entnommen und mit der 9fachen Menge Aceton verdünnt. Während der Lagerung bei -20°C über Nacht wurden die Proteine aus der Lösung gefällt. Nach Zentrifugation der gefällten Proteine bei 14000 U/min und 4°C für 10 Minuten wurde der Überstand abgekippt und das Proteinpellet in 25 μ l Ladepuffer durch Vortexen und 15minütiger Inkubation auf einem Inkubationsschüttler gelöst.

2.2.7.3 SDS-Page und Westernblot

Mittels SDS-Page (*Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis*) werden Proteine anhand ihrer Größe in einem elektrischen Feld in einem Gel aufgetrennt. In dieser Arbeit wurden diskontinuierliche Gele verwendet, d.h. es wurden zwei unterschiedliche Gele (ein Trenn- und ein Sammelgel) verwendet. Das Sammelgel diente dazu, die Proteine der Lösung an einem Startpunkt zu sammeln, damit alle zeitgleich in das Trenngel einwandern können. Ebenso wurden je nach Größe der gewünschten Proteine unterschiedliche Trenngele verwendet. Für Proteine mit einem Molekulargewicht größer 100 kDa wurden 7,5% Polyacrylamidgele verwendet, für Proteine kleiner 100 kDa 10% Polyacrylamidgele. Hierbei spielen die Stoffe APS

(*Ammonium Persulfate*) und TEMED (*Tetramethylethyldiamin*) eine entscheidende Rolle in der Polymerisierung der Gele. Die Gele wurden in Glaskammern der Firma BioRad gegossen. Begonnen wurde mit den Trenngelen, welche mit 100% Ethanol überschichtet wurden. Nach 20minütiger Polymerisationszeit konnten nach Entfernung des Ethanols hierauf die Sammelgele gegossen und innerhalb von 15 Minuten auspolymerisiert werden. Um Probestaschen zu erhalten wurde in das Sammelgel ein *sample well* Kamm eingelegt. Anschließend wurden die Gele direkt verwendet oder für maximal 1 Woche in feuchten Tüchern bei 4°C gelagert.

Die in Ladepuffer gelösten Proteinlysate wurden zunächst für 10 Minuten bei 95°C zur Denaturierung erhitzt. Während der Abkühlung auf Eis wurden die Gele in die Laufkammern eingesetzt, die Kämme vorsichtig gezogen und die Kammer mit 1x SDS-Laufpuffer bis zur Markierung gefüllt. Um eine Standardlaufreihe zu erhalten, wurden in die erste Tasche 5 µl *BenchMark Prestained Protein Ladder*, sowie 3 µl *MagicMark XP* als Molekulargewichtsstandard pipettiert. Die übrigen Taschen wurden mit je 10 µl Proteinlysat befüllt. Nach Anschluss an eine Spannungsquelle von 75 Volt wurde das Durchlaufen der Sammelgelphase abgewartet und anschließend die Spannung auf 125 Volt erhöht. Bei Erreichen der Lauffront des unteren Endes des Geles wurde die Spannungsquelle entfernt.

Im nächsten Schritt wurden die nach Größe aufgetrennten Proteine durch das sogenannte „Blotten“ auf eine PVDF-Membran transferiert. In der hier vorliegenden Arbeit wurde das Semi-dry Blotverfahren der Apparatur TransBlot® Turbo (BioRad) verwendet. Mittels angelegter Spannung wandern die negativ geladenen Proteine aus dem Gel in Richtung Anode. Auf diesem Weg werden sie von der PVDF-Membran gebunden und können dort mittels Antikörpern detektiert werden.

Zunächst wurden die zugeschnittenen PVDF-Membranen durch ein 1minütiges 100% Ethanolbad, Waschen in Aqua dest. und Waschen in Anodenpuffer aktiviert. Ebenso wurden jeweils 6 Lagen Filterpapier in Anoden- bzw. Kathodenpuffer äquilibriert. Nun wurde die Anodenseite mit Anodenpuffer angefeuchtet. Der Aufbau des Blots wurde direkt in der Blot-Apparatur nach Folgendem Schema durchgeführt (Abb. 9).

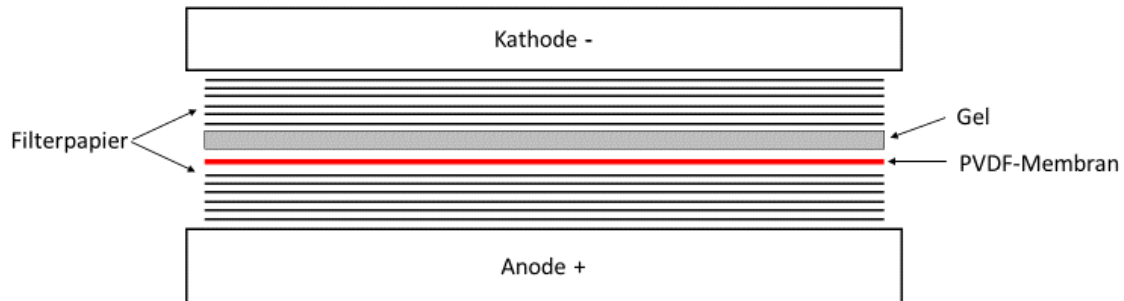


Abb. 9 Schematische Darstellung der Blotting-Apparatur

Durch eine angelegte Spannung von 25V wandern die im Gel gesammelten Proteine entlang des Spannungsgefälles von der Kathode in Richtung Anode und werden hierdurch auf die PVDF-Membran übertragen. Dort können sie mittels Antikörperreaktionen visualisiert und quantifiziert werden.

Am Ende wurden eventuelle Luftblasen mithilfe eines Blotrollers entfernt. Nach Aufsetzen der mit Kathodenpuffer angefeuchteten Kathode, welche durch Drehen fixiert wurde, wurde die Blot-Apparatur in die Spannungsquelle geschoben. Der Blot erfolgte für 30 Minuten bei 25 Volt.

Um die gewünschten Proteine mittels proteinspezifischer Antikörpermarkierung und gekoppelter Chemielumineszenzreaktion nachzuweisen, mussten folgende Schritte durchgeführt werden. Zunächst wurden die PVDF-Membranen aus der Blot-Apparatur entfernt. Es erfolgte die einstündige Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf einem Schüttler. Als Blocklösung wurden je nach Primärantikörper 2-5% Milchpulver in 1x TBST (*Tris-buffered saline with Tween20*), 2-5% BSA in 1x TBST oder 1x Roti®-block verwendet. Anschließend wurden die Membranen bei 4°C über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert. Es wurden monoklonale Mausantikörper gegen ERK (Extracellular signal-regulated kinase, AMD) und monoklonale Hasenantikörper gegen pERK THR202/TYR204, FAK (Focal adhesion kinase), pFAK Y397, Paxillin, pPaxillin Y118, SRC (Rous sarcoma oncogene cellular homolog), pSRC Y416, SHC (SH2-containing collagen-related proteins), pSHC Y239/240, AKT (AKT8 virus oncogene cellular homolog) und pAKT S473 and T308 in einem Verdünnungsverhältnis von

1:1000 verwendet. β -Actin-Antikörper als Bezugsbande wurden in einer Konzentration von 1:5000 in Roti®-block verwendet. Nach dreimaligem Waschen mit je 1x TBST für 10 Minuten folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper gegen die jeweilige Spezies des Primärantikörpers für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Dieser wurde in einem Verdünnungsverhältnis von 1:1000 verwendet. Die Sekundärantikörper sind mit Peroxidase gekoppelt, welches mit Luminol zu einer Chemielumineszenzreaktion führt. Nach dreimaligem Waschen mit 1x TBST für 10 Minuten wurden die Membranen mit 4 ml ECL-Reagenz (*enhanced chemiluminescence*) für 1 Minute bedeckt. Das ECL-Reagenz besteht zu gleichen Teilen aus einer oxidieren Substanz und einem *Enhanced Luminol Reagenz Plus*. Nach der Inkubation wurde die Membran zwischen zwei Folien gelegt und im Fluorchem Detektor (BioLabTec) die Chemielumineszenz detektiert. Die Auswertung der detektierten Banden erfolgte mittels densometrischer Auswertung am Computer mit Hilfe des Programms Alpha View SA®.

Falls die Membranen zur Detektion eines weiteren Proteins herangezogen wurden, wurden zunächst die Antikörper entfernt. Nach 5minütigem Waschen in destilliertem Wasser wurden die Membranen für 20 Minuten in 0,2M NaOH (*Natriumhydroxid*) eingelegt, um die Antikörper zu lösen. Anschließend wurden die Membranen erneut für 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Nun konnte mit einem neuen Blockvorgang der Versuch wiederholt werden.

3.2.8 GloMax Proliferations- und Zytotoxizitätssay

Um den Einfluss von Integrin- α 5 auf Zellproliferation und Zelltoxizität zu bestimmen, wurden der CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay und CellTox™ Green Cytotoxicity Assay von Promega verwendet. Beide Versuche konnten parallel in einem Ansatz durchgeführt werden.

Der CellTiter-Glo®-Versuch basiert auf dem Umsatz von Luciferin zu Oxyluciferin mithilfe der Ultra-Glo™rLuciferase. Proportional zur ATP-Generierung (*Adenosin-triphosphat*) der Zelle wird hierbei lumineszierendes Oxyluciferin produziert. Anhand der ATP- Stoffwechsellage der Zelle kann auf dessen Aktivitätszustand zurückgeschlossen werden. Hohe ATP-Konzentrationen und somit ein starkes Lumineszenzsignal bedeuten eine hohe Zellviabilität (Abb.10).

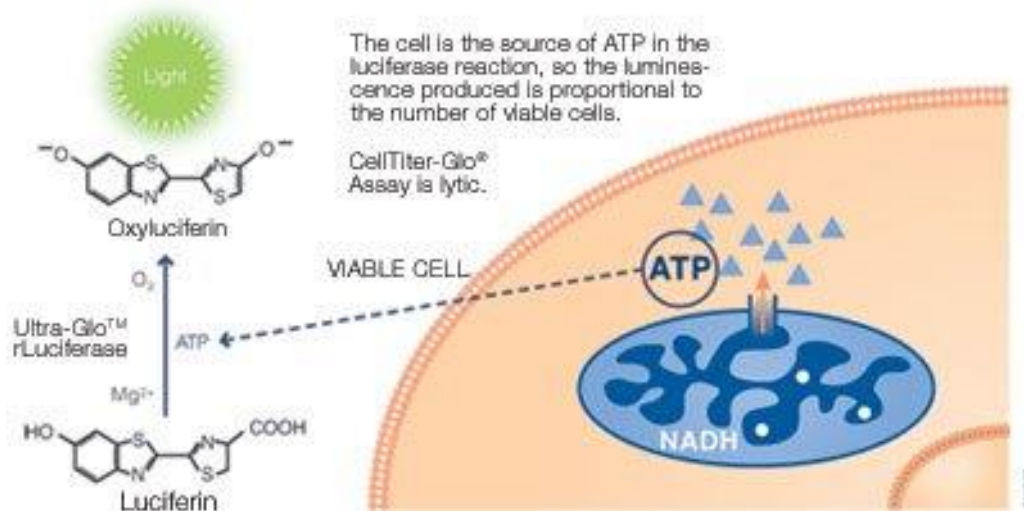


Abb. 10 Schematische Darstellung des CellTiter-Glo® Versuchs

Luciferin wird durch die Luciferase ATP-abhängig zu Oxyluciferin und Licht umgewandelt. Hierbei ist die Stärke des Lumineszenzsignals direkt proportional zu Zellzahl und -stoffwechsel. Eine Erhöhung des Lumineszenzsignals lässt sich so auf eine erhöhte Proliferation und Zellvermehrung zurückführen, nach Promega Corporation (170).

Der CellTox™- Versuch hingegen basiert auf der Bindung von CellTox™ Green dye an Teile der DNA. Durch die Bindung wird die Lumineszenz des Färbstoffes verstärkt und kann nun in einem Fluoreszenzdetektionsmodul gemessen werden. Da der Färbstoff nicht membrangängig ist, kann eine Bindung an die intrazelluläre DNA nur nach Zelluntergang und Membranzerstörung stattfinden. Das hierbei generierte Signal ist direkt proportional zur Zellzytotoxizität (Abb. 11).

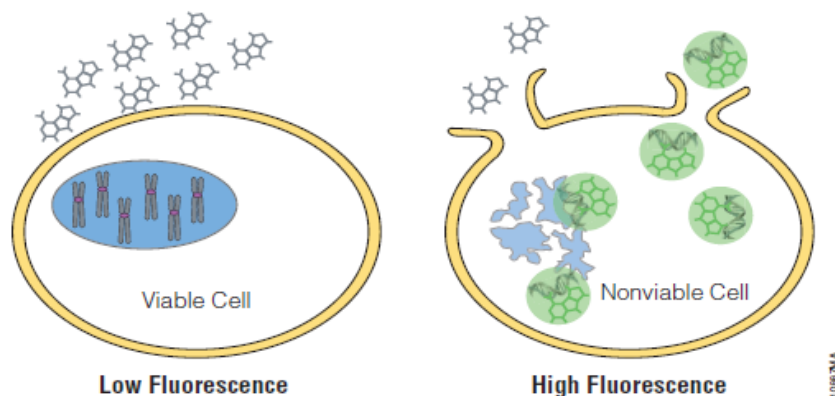


Abb. 11 Schematische Darstellung des CellTox™ Green Cytotoxicity Assays

Da bei abgestorbenen Zellen die Integrität der zellulären Membranen verloren geht, kann CellTox™ Green dye an DNA-Bestandteile der Zellen binden und hierdurch eine verstärkte Fluoreszenzwirkung detektiert werden. Ein erhöhtes Fluoreszenzsignal lässt hierbei auf einen verstärkten Zelluntergang schließen, nach Promega Corporation (171).

3. Material und Methoden

50 µl/Well Tumorzellsuspension (1×10^5 Zellen/ml) wurden in eine schwarze 96-Well Platte mit transparentem Untergrund pipettiert. Es wurden drei Gruppen unterschieden. Eine unbehandelte Negativkontrolle, eine mit Fibronectin 10 µg/ml behandelte Positivkontrolle, sowie eine mit P1D6 10 µg/ml und Fibronectin 10 µg/ml behandelte Interventionsgruppe. Es wurden jeweils Vierfachansätze verwendet. Nach Inkubation für 24 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre wurden 50 µl der Kit-Reagenzien zugesetzt. Es handelte sich hierbei um ein Gemisch aus Vollmedium und jeweils 0,2% CellTox[®] Green und Nanoluc. Der Messvorgang konnte nun beginnen. Zwischen jedem Messvorgang wurde die 96-Well Platte in den Inkubator zurückgegeben und bei 37°C, 5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Nach 60 Minuten wurde ein Messzeitpunkt t(0) bestimmt. Die nun folgenden Messungen wurden in einem Abstand von 30 Minuten durchgeführt. An die nächste Kontrollmessung schloss sich direkt die Behandlung der Interventionsreihe mit P1D6 an. Nach der nächsten Messung erfolgte die Behandlung der Positivkontrolle und der Interventionsreihe mit Fibronectin. Nun wurden weitere acht Messungen durchgeführt (bis t = ~360 Minuten). Die Messung selbst fand in einem GloMax[®] Multidetector System der Firma Promega statt. Für die Fluoreszenz wurde eine Extinktion bei 525 nm und eine Emission bei 580-640 nm grünen Farbstoffs erfasst. Die Lumineszenz wurde direkt durch einen Detektor erfasst. Die Ergebnisse wurden anschließend in eine Exceltabelle überführt, der Mittelwert gebildet und eine Standardabweichung vom Mittelwert bestimmt. Ebenso wurde ein Diagramm über den zeitlichen Verlauf erstellt.

4. Ergebnisse

4.1 Expressionslevel von Integrin- α 5 in verschiedenen NZK-Zelllinien

Um die geeigneten Zelllinien für die oben genannten Versuche zu ermitteln, wurde zunächst eine FACS-Untersuchung mit den NZK-Zelllinien CCF-RC 1, Caki-1, Caki-2, A498, sowie 786-O durchgeführt, um die Expressionslevel von Integrin- α 5 zu bestimmen. Es konnte gezeigt werden, dass die Zelllinie 786-O das niedrigste Integrin- α 5-Expressionslevel aufwies. In Relation zu dem Expressionslevel von 786-O, wiesen die Zelllinien Caki-2 (1,85fach), A-498 (2,23fach), CCF-RC1 (5,07fach) und Caki-1 (6,16fach) in aufsteigender Reihenfolge eine höhere Integrin- α 5-Expression auf. Da das Ziel dieser Arbeit die Rolle des Integrins α 5 bei Migrations- und Adhäsionsvorgängen, sowie die durch das Oberflächenmolekül beeinflusste Signalkaskade war, wurden für alle folgenden Versuche nur die Zelllinien CCF-RC-1 und Caki-1 verwendet, da diese die beiden höchsten Expressionslevel aufwiesen (Abb. 12).

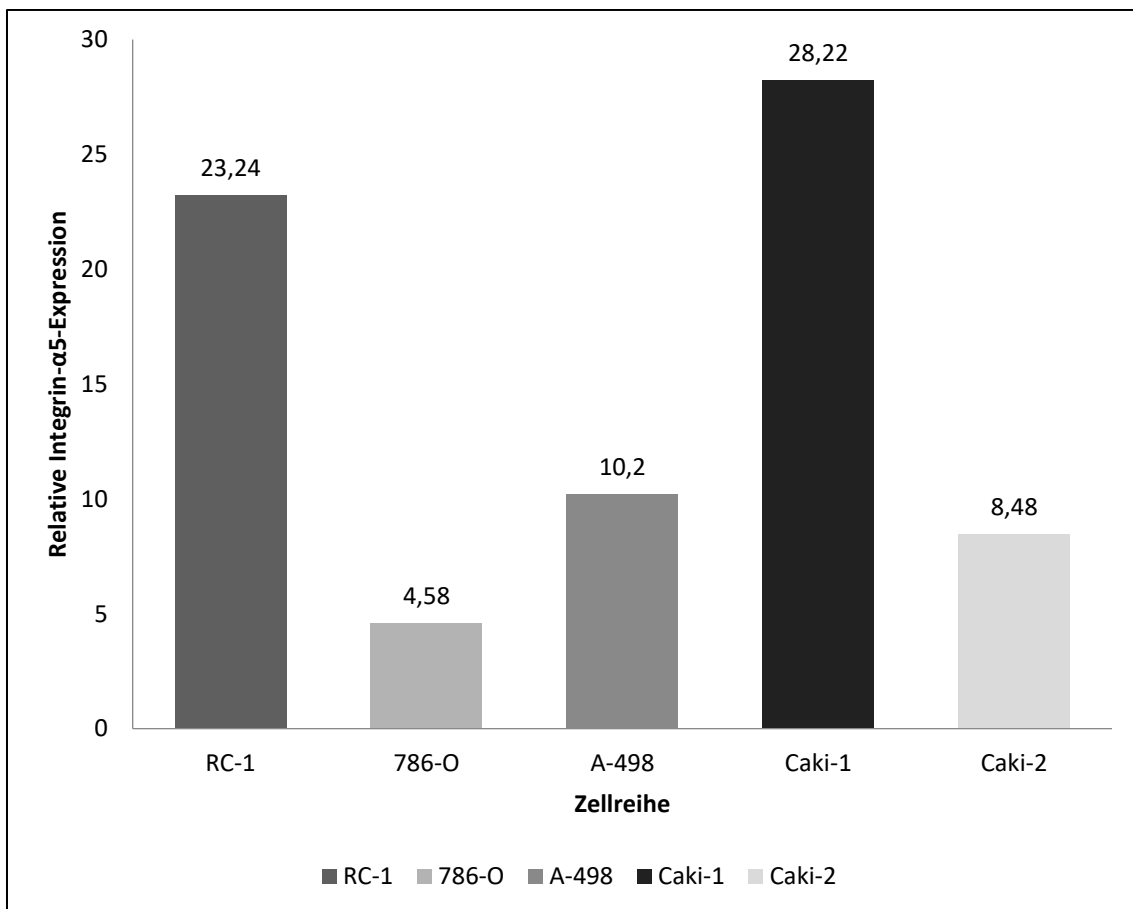


Abb. 12 Relative Integrin- α 5-Expression bei unterschiedlichen NZK-Zelllinien

4. Ergebnisse

Dargestellt ist die errechnete relative Integrin- α 5-Expression der Zelllinien CCF-RC-1, 786-O, A-498, Caki-1 und Caki-2. Errechnet wurde die relative Integrin- α 5-Expression durch Subtraktion der gemessenen Werten der Isotypenkontrolle von den Werten der Integrin- α 5-Messung. Es zeigt sich folgendes Expressionsmuster in aufsteigender Reihenfolge: 786-O < Caki-2 < A-498 < CCF RC-1, < Caki-1. Die Expressionsuntersuchung wurde einmal durchgeführt (n = 1) (148).

4.2 Einfluss von Integrin- α 5 auf die Migration

Um den Einfluss von Integrin- α 5 auf die gerichtete Migration zu analysieren, wurde das Migrationsverhalten der NZK-Zellen in einer modifizierten Boydenkammer in Richtung der Chemotaxine Fibronectin und Fibrinogen untersucht.

In einem Vorversuch wurde das Migrationspotential der beiden Zelllinien CCF-RC1 und Caki-1 in Richtung des Chemotaxins Fibrinogen untersucht, da eine Bindung von Fibrinogen an Integrin- α 5 für endotheliale und vermutlich andere Zellen beschrieben wurde (172, 173). Um einen chemotaktischen Effekt von Fibrinogen auf Zellen der Linien Caki-1 und CCF-RC1 nachzuweisen, wurde mittels einer Konzentrationsreihe in aufsteigender Konzentration von 20 μ g/ml bis 200 μ g/ml die optimale Fibrinogenkonzentration analysiert. Im Gegensatz zu Fibronectin, welches als Positivkontrolle eingesetzt wurde, migrierten bei der Verwendung von Fibrinogen als Chemotaxin nur äußerst wenige Zellen. Maximal 3,5% der Zellen im Vergleich zur Positivkontrolle durchwanderten die poröse Membran. Auch konnte kein steigernder Effekt durch Erhöhung der Chemotaxinkonzentration beobachtet werden. Vielmehr nahm die prozentuale Migration bei sehr hohen Konzentrationen ein wenig ab (100 μ g/ml versus 200 μ g/ml). Bei Caki-1 zeigte sich dies in einer prozentualen Reduktion um 1,2%, bei CCF-RC1 sank die relative migrierte Zellzahl um 1,1% (Abb. 13).

4. Ergebnisse

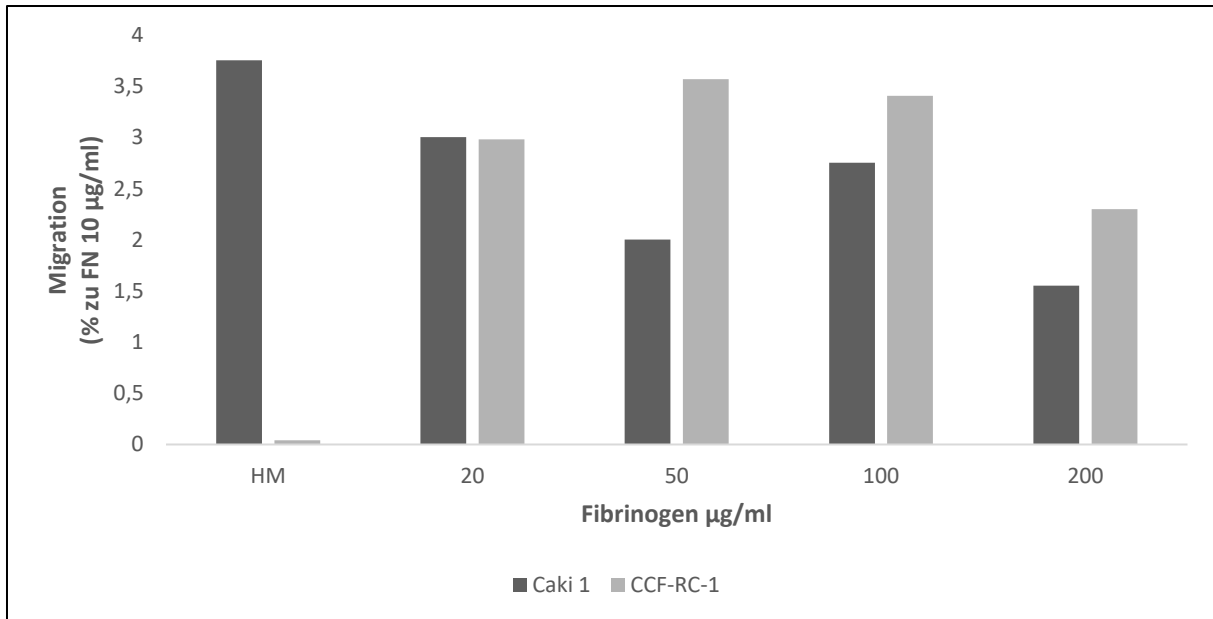


Abb. 13 Prozentuale Migration von Zellen der Linien Caki-1 und CCF-RC 1 mit Fibrinogen unterschiedlicher Konzentration (20 bis 200 $\mu\text{g/ml}$) als Chemotaxin

HM: serumfreies Medium; FB: Fibrinogen in $\mu\text{g/ml}$. Als Bezugspunkt wurde FN als Positivkontrolle 100% gewählt (aus Übersichtsgründen nicht dargestellt). Trotz steigender Fibrinogenkonzentration wurde keine Zunahme im Migrationsverhalten der Zellen beobachtet. Da als Vorversuch nur eine Versuchsreihe durchgeführt wurde, können keine Fehlerindikatoren angegeben werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Fibrinogen als Extrazellulärmatrixkomponente keinen chemotaktischen Einfluss auf Nierenkarzinomzellen der beiden genannten Zelllinien hat. Im Folgenden wurde daher der Einfluss einer Integrin- α 5-Hemmung nur auf das Migrationsverhalten in Richtung Fibronectin untersucht.

Die Integrin- α 5 hochexprimierenden Zelllinien Caki-1 und CCF-RC1 wurden mit einem Integrin- α 5-Antikörper (P1D6) behandelt. Verglichen wurde die prozentuale Veränderung des Migrationsverhaltens der Zellen, die mit Integrin- α 5-Antikörpern behandelt wurden mit der mit Isotypenkontrolle behandelten Zellen. Hierbei wurde die unbehandelte Positivkontrolle als Referenz festgelegt.

4. Ergebnisse

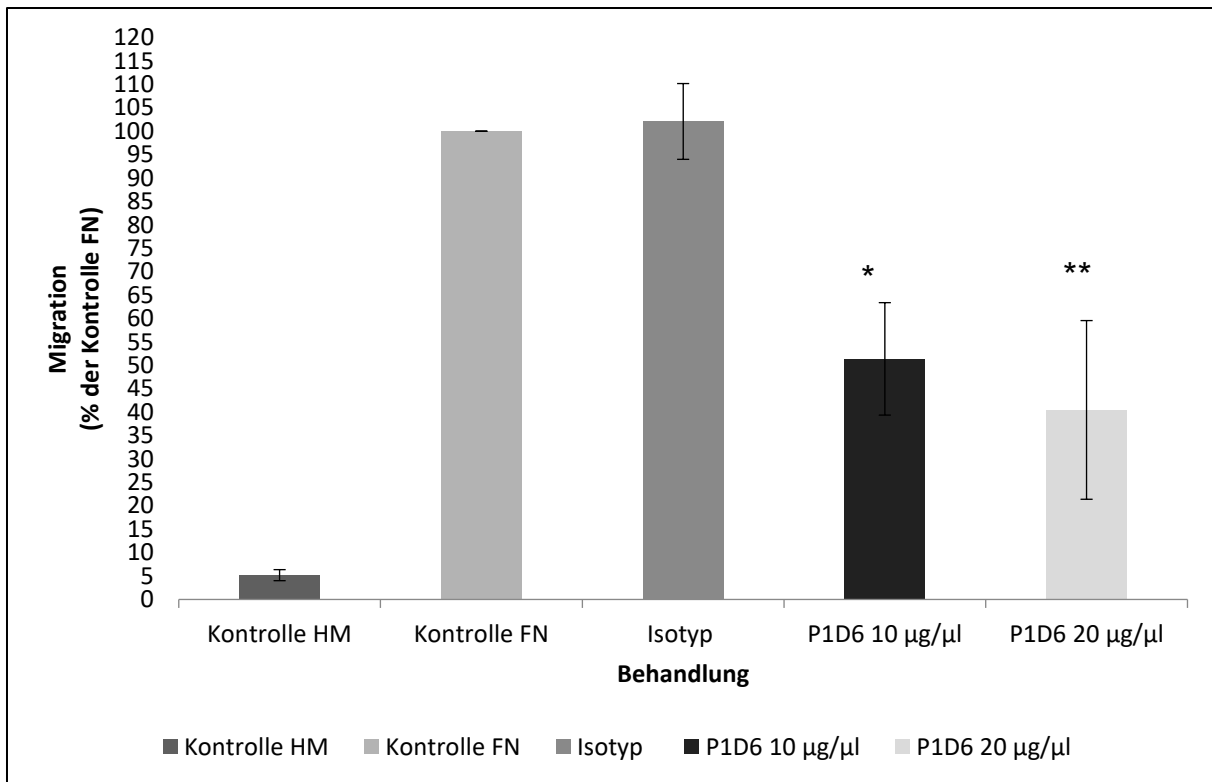


Abb. 14 Migrationsverhalten der Caki-1-Zellen mit Fibronektin (10 µg/ml) als Chemotaxin bei Behandlung mit einem Integrin- α 5-Antikörper (P1D6)

Dargestellt ist die Migration in Richtung des Chemotaxins Fibronektin (FN 10 µg/ml). Die unbehandelte Positivkontrolle Kontrolle FN wurde hierbei als Referenz festgelegt. Die Behandlung der Caki-1-Zellen mit P1D6 (Integrin- α 5-Antikörper) zeigte eine signifikante Reduktion des Migrationsverhaltens verglichen mit der Isotypenbehandlung (* Student's t-test, $p = 0,010$). Bei Steigerung der P1D6-Konzentration auf 20 µg/ml konnte verglichen mit der Isotypenkontrolle die statistische Signifikanz bestätigt werden ($p = 0,038$). Bei Vergleich von P1D6 10 µg/ml mit P1D6 20 µg/ml konnte keine signifikante Migrationsreduktion gezeigt werden (** Student's t-test, $p = 0,31$). Es wurden aus Dreifachansätzen Mittelwerte pro Versuchsdurchgang gebildet. Aus fünf Versuchsdurchgängen ($n = 5$) wurde ein Gesamtmittelwert, sowie die Standardabweichung vom Mittelwert gebildet und hier graphisch dargestellt. HM: serumfreies Medium; FN: Fibronektin; P1D6: Integrin- α 5-Antikörper (148).

Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Zellen mit P1D6 (Integrin- α 5-Antikörper) eine deutliche Reduktion im Migrationsverhalten bewirkte. So konnte bei Behandlung mit 10 µg/ml P1D6 eine Reduktion von 51% gegenüber der Isotypenkontrolle dargelegt werden. Bei Steigerung der Antikörperkonzentration auf 20 µg/ml konnte die Anzahl migrierter Zellen um weitere 11% gesenkt werden. Bei Vergleich der Isotypenkontrolle gegenüber der mit P1D6 behandelten Zellen in einer Konzentration von 10 µg/ml betrug der p-Wert 0,010. Bei Vergleich der Migration nach Behandlung mit den beiden Antikörperkonzentrationen zeigte sich ein p-Wert von 0,31.

4. Ergebnisse

Die Steigerung der Antikörperkonzentration gegen Integrin- α 5 scheint keinen bedeutenden Effekt in Bezug auf eine Migrationsreduktion zu haben (Abb. 14).

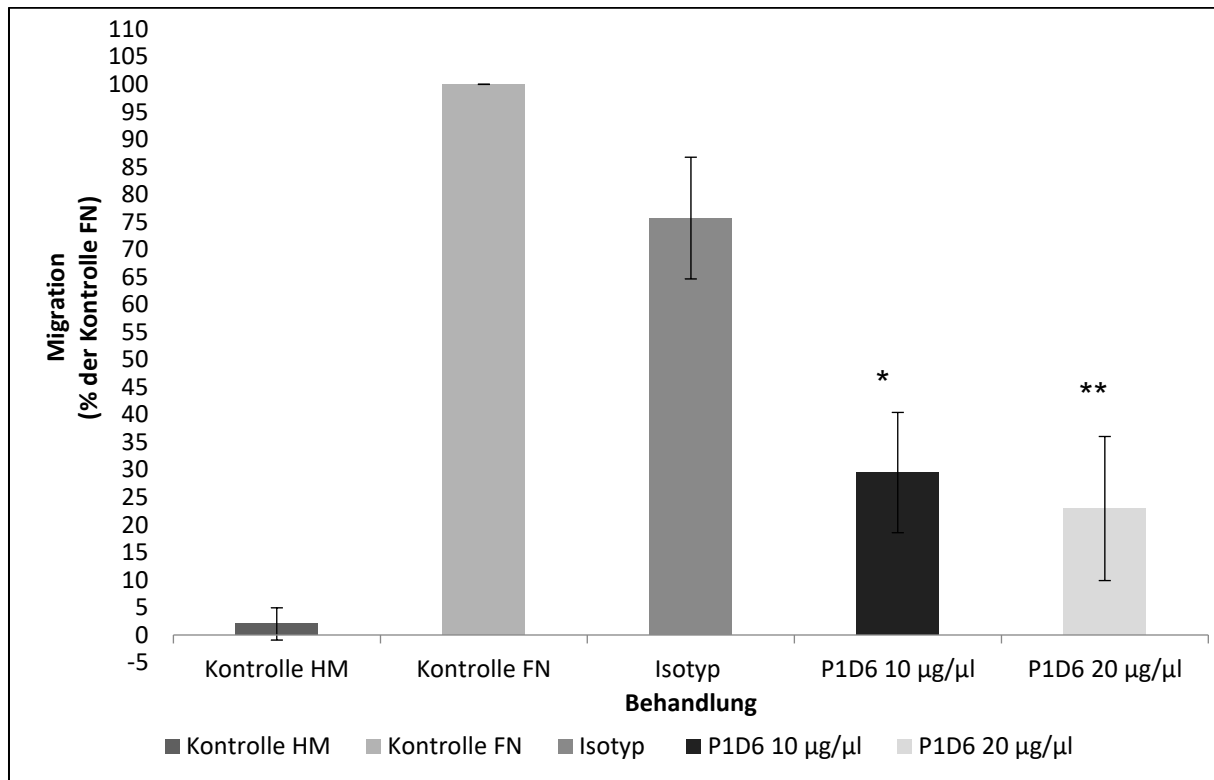


Abb. 15 Migrationsverhalten der CCF-RC1 Zellen mit Fibronektin (10 µg/ml) als Chemotaxin bei Behandlung mit einem Integrin- α 5-Antikörper (P1D6)

Dargestellt ist die Migration in Richtung des Chemotaxins Fibronektin (FN) 10 µg/ml. Die unbehandelte Positivkontrolle Kontrolle FN wurde hierbei als Referenz festgelegt. Die Behandlung der CCF-RC 1-Zellen mit P1D6 (Integrin- α 5-Antikörper) zeigte eine signifikante Reduktion des Migrationsverhaltens verglichen mit der Isotypenbehandlung (* Student's t-test $p < 0,00005$). Bei Steigerung der P1D6 Konzentration auf 20 µg/ml konnte verglichen mit der Isotypenkontrolle die statistische Signifikanz bestätigt werden (** Student's t-test, $p = 0,011$). Bei Vergleich von P1D6 10 µg/ml mit P1D6 20 µg/ml konnte keine signifikante Migrationsreduktion gezeigt werden (Student's t-test, $p = 0,38$). Es wurden aus Dreifachansätzen Mittelwerte pro Versuchsdurchgang gebildet. Aus fünf Versuchsdurchgängen ($n = 5$) wurde der Gesamtmittelwert, sowie die Standardabweichung vom Mittelwert gebildet und hier graphisch dargestellt. HM: serumfreies Medium; FN: Fibronektin; P1D6: Integrin- α 5-Antikörper (148).

Auch bei der Zelllinie CCF-RC 1 konnte durch Blockierung der Integrine- α 5 mit P1D6-Antikörpern das Migrationsverhalten in Richtung Fibronektin signifikant reduziert werden. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion bei P1D6-Behandlung (10 µg/ml) von 46 % verglichen mit der Isotypenkontrolle. Bei Steigerung der Integrin- α 5-Antikörperkonzentration auf 20 µg/ml konnte die Anzahl migrierter Zellen um weitere 6,5% gesenkt werden. Der p-Wert betrug hier im ersten Vergleich $p < 0,00005$. Bei

Vergleich der beiden unterschiedlichen P1D6-Konzentrationen betrug der p-Wert $p = 0,38$ (Abb. 15).

Es konnte gezeigt werden, dass Integrin- $\alpha 5$ an der zielgerichteten Migration bei Nierenzellkarzinomzellen beteiligt ist. Durch Inhibierung von Integrin- $\alpha 5$ zeigten die beiden Zelllinie Caki-1 und CCF-RC1 ein deutlich reduziertes Migrationspotential in Richtung des Chemotaxins Fibronectin. In einem nächsten Schritt wurde der Einfluss von Integrin- $\alpha 5$ auf das Adhäsionsverhalten untersucht.

4.3 Einfluss von Integrin- $\alpha 5$ auf die zelluläre Adhäsion

Integrine als Zelloberflächenmoleküle sind für die Adhäsion von Zellen an Komponenten der EZM unabkömmlich. Aus diesem Grund spielen sie auch bei Metastasierungsvorgängen eine große Rolle (174). Um den Einfluss von Integrin- $\alpha 5$ auf das Adhäsionsverhalten von Nierenzellkarzinomzellen näher zu analysieren, wurde das Adhäsionsverhalten unbehandelter Zellen der Zelllinien Caki-1 und CCF-RC1 mit solchen verglichen, die mit $10 \mu\text{g/ml}$ Integrin- $\alpha 5$ -Antikörper (P1D6) für 30 Minuten behandelt wurden. Untersucht wurde die Adhäsion an folgenden EZM-Komponenten: Laminin $50 \mu\text{g/ml}$, Fibronectin $10 \mu\text{g/ml}$, Kollagen IV $10 \mu\text{g/ml}$, Fibrinogen 1mg/ml und als Negativkontrolle BSA $10 \mu\text{g/ml}$. Der Fokus lag hierbei auf der prozentualen Adhäsionsreduktion zwischen der Isotypenkontrolle und der mit P1D6 ($10 \mu\text{g/ml}$) behandelten Versuchsreihe.

Die Zelllinie Caki-1 adhärierte an alle oben genannten EZM-Komponenten. Bei den EZM-Komponenten Laminin, Kollagen IV und Fibrinogen konnte durch die Behandlung mit Integrin- $\alpha 5$ -Antikörpern (P1D6) keine Adhäsionsreduktion beobachtet werden ($p_{\text{Laminin}} = 0,46$, $p_{\text{KollagenIV}} = 0,12$, $p_{\text{Fibrinogen}} = 0,074$). Einzig bei Fibronectin reduzierte sich die Anzahl adhärierter Zellen signifikant um 40% ($p = 0,0093$, Abb. 16).

4. Ergebnisse

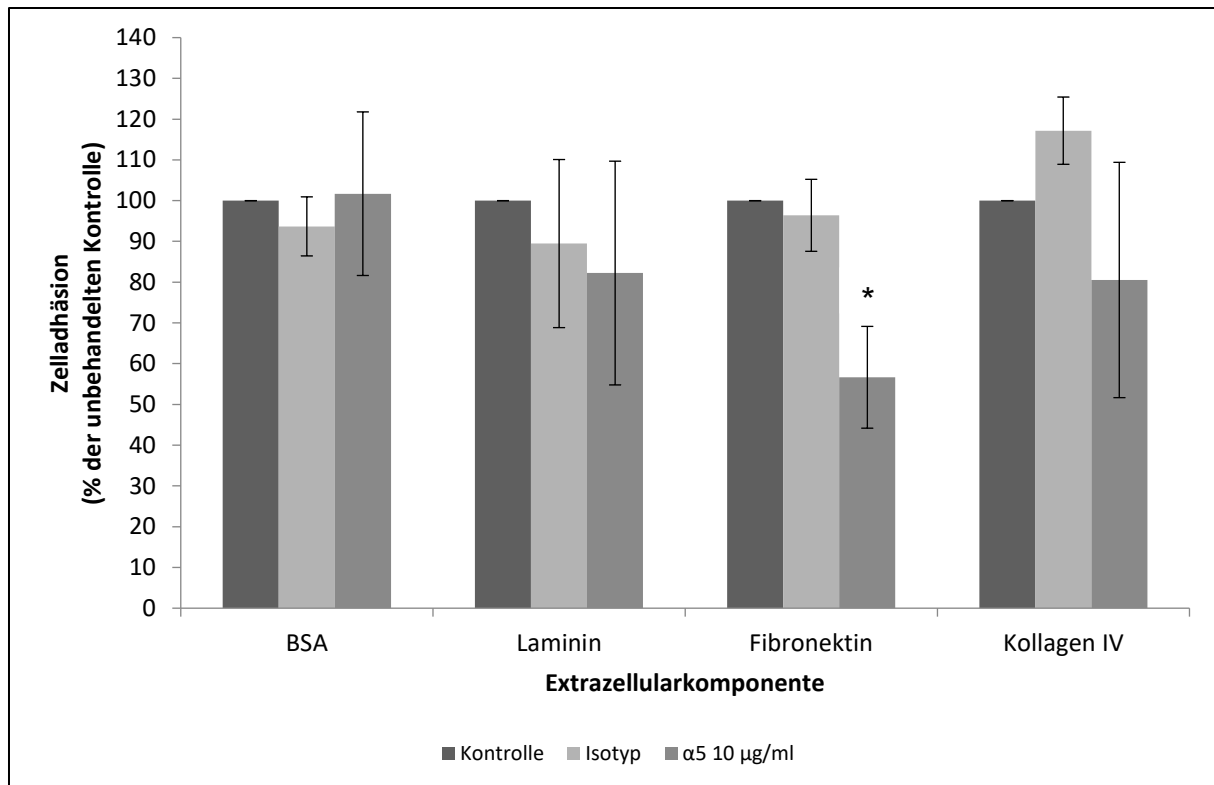


Abb. 16 Adhäsion der Zelllinie Caki-1 an Komponenten der Extrazellulärmatrix

Dargestellt ist die Adhäsion von Caki-1-Zellen an die angegebenen Komponenten der Extrazellulärmatrix. Die Isotypenkontrolle wurde für 30 Minuten mit EMR8-5-Antikörpern (10 $\mu\text{g/ml}$), die Integrin- $\alpha 5$ -Gruppe mit P1D6-Antikörpern (10 $\mu\text{g/ml}$) behandelt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts bei drei Versuchsdurchgängen ($n = 3$) an. Einzig bei Fibronectin konnte eine statistisch signifikante Adhäsionsreduktion durch Blockierung der Integrine $\alpha 5$ gezeigt werden (* student's t-test, $p = 0,0093$) (148).

Auch Tumorzellen der Zelllinie CCF-RC1 konnten alle genannten EZM-Bestandteile als Adhäsionspartner binden. Bei den EZM-Komponenten Laminin und Kollagen IV ergab die Auswertung keine signifikante Änderung der Zelladhäsion. Eine signifikante Reduktion im Adhäsionsverhalten wurde bei der EZM-Komponente Fibronectin beobachtet. Von gemittelter Isotypenkontrolle (94% der unbehandelten Kontrollen) sank hierbei die Menge der adhärenierten Zellen auf 46% bei vorheriger Integrin- $\alpha 5$ -Antikörperbehandlung. Dies entspricht einer signifikanten Reduktion von 48% ($p = 0,033$, Abb. 17).

4. Ergebnisse

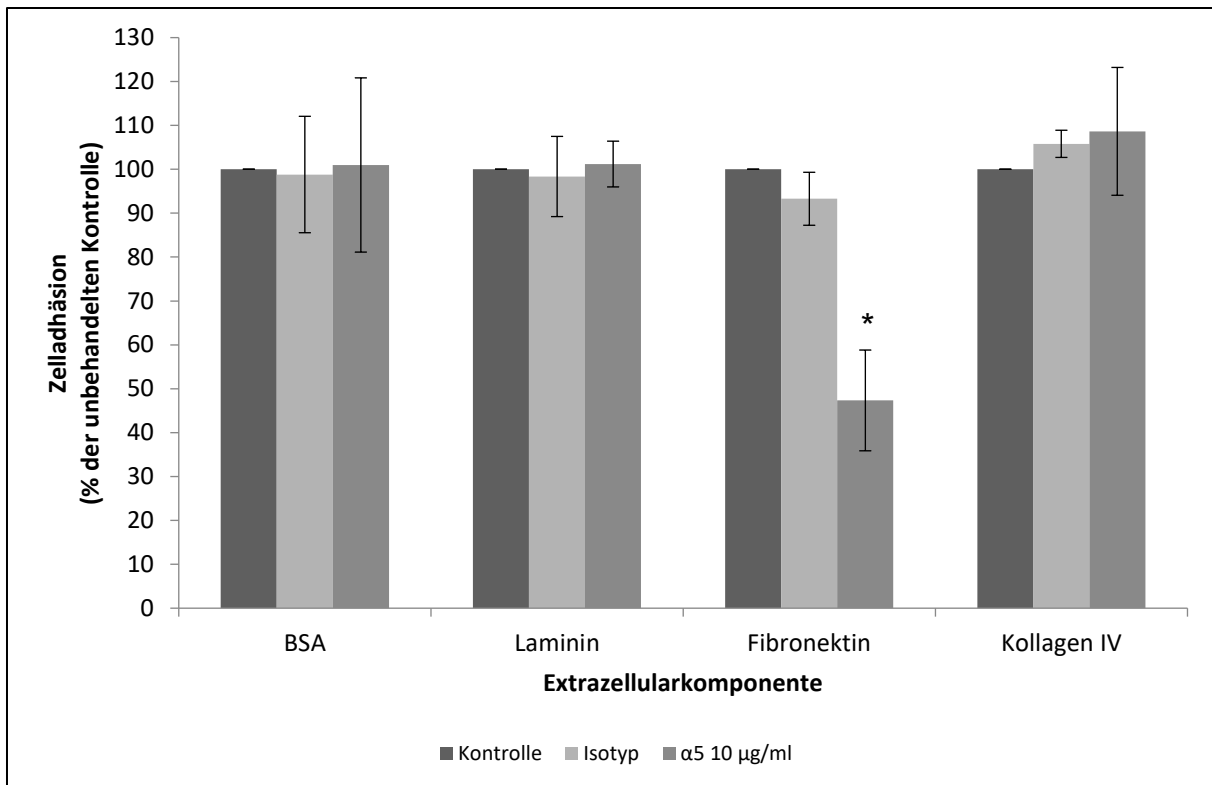


Abb. 17 Adhäsion der Zelllinie CCF-RC 1 an Komponenten der Extrazellulärmatrix

Dargestellt ist die Adhäsion von CCF-RC-1-Zellen an die angegebenen Komponenten der Extrazellulärmatrix. Die Isotypenkontrolle wurde für 30 Minuten mit EMR8-5-Antikörpern (10 $\mu\text{g/ml}$), die Integrin- $\alpha 5$ -Gruppe mit P1D6-Antikörpern (10 $\mu\text{g/ml}$) behandelt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts bei drei Versuchsdurchgängen ($n = 3$) wieder. Einzig bei Fibronectin konnte eine statistisch signifikante Adhäsionsreduktion durch Blockierung des Integrins $\alpha 5$ gezeigt werden (* student's t-test, $p = 0,033$) (148).

Neben oben genannten EZM-Komponenten wurde Fibrinogen als weiterer Bindungspartner für Integrin- $\alpha 5$ bei bekannten RGD-Sequenzen untersucht (172, 173). Zunächst wurde die Adhäsion der Zelllinien Caki-1 und CCF-RC-1 an einer Fibrinogen Konzentrationsreihe bestimmt, um die optimale Konzentration zu ermitteln. Die verwendeten Konzentrationen betragen 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 1 mg/ml , sowie 2 mg/ml . Prozentual bezogen wurden die ermittelten Werte auf Fibronectin als Positivkontrolle, da bei diesem als einziges Protein bisher ein Effekt gezeigt werden konnte.

Bei steigender Fibrinogenkonzentration konnte eine Adhäsionssteigerung beobachtet werden. So erreichte man bei der Zelllinie CCF-RC1 bereits bei einer Fibrinogenkonzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ ein vergleichbares Adhäsionsergebnis wie bei der Adhäsion an Fibronectin. Die Zelllinie Caki-1 erreichte selbst bei hohen

4. Ergebnisse

Konzentrationen maximal eine 65%ige Adhäsion im Vergleich zu Fibronectin (Abb. 18).

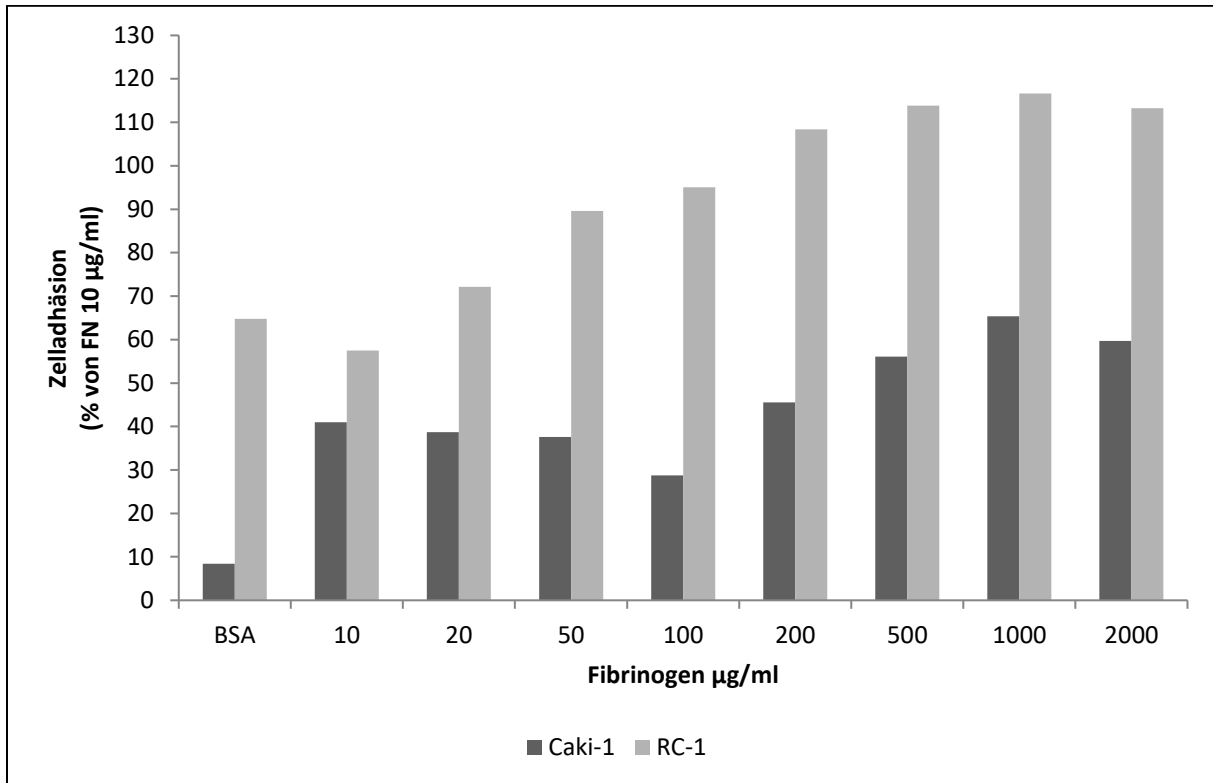


Abb. 18 Adhäsion der Zelllinien Caki-1 und CCF-RC1 an Fibrinogen unterschiedlicher Konzentration

Dargestellt ist das Adhäsionsverhalten der Zelllinien Caki-1 und CCF-RC1 an die Extrazellulärmatrixkomponente Fibrinogen. Die verwendeten Konzentrationen betragen 10 µg/ml bis 2 mg/ml. Als Referenz und Positivkontrolle wurde Fibronectin in einer Konzentration von 10 µg/ml gewählt (aus Übersichtsgründen nicht dargestellt). Das maximale Adhäsionsverhalten beider Zelllinien konnte bei einer Fibrinogenkonzentration von 1 mg/ml ermittelt werden (Caki-1 65%, CCF-RC1 117%). Es wurde im Rahmen eines Vorversuchs ein Versuchsdurchgang durchgeführt (n = 1).

Schlussfolgernd konnte ein für beide Zelllinien maximales Adhäsionsverhalten bei einer Fibrinogenkonzentration von 1 mg/ml ermittelt werden. So adhärten bei der Zelllinie Caki-1 65% der Zellen, bei CCF-RC1 117% der Zellen verglichen zur Zelladhäsion an Fibronectin. Für die Ermittlung des Einflusses von Integrin- α 5 auf das Adhäsionsverhalten wurden im weiteren Verlauf Adhäsionsversuche nach Behandlung der Zellen mit Integrin- α 5-Antikörpern (P1D6 10 µg/ml) und einer Fibrinogenkonzentration von 1 mg/ml als Extrazellulärmatrixkomponente analog zu oben genannten Matrices durchgeführt.

4. Ergebnisse

Bei der Zelllinie Caki-1 konnte bezogen auf die Isotypenkontrolle eine prozentuale Reduktion um 30% ermittelt werden. Eine statistisch signifikante Reduktion der Adhäsion mittels P1D6-Behandlung konnte nicht nachgewiesen werden. Die Extrazellulärkomponente Fibronectin wurde hierbei als Positivkontrolle mitgeführt (Abb. 19).

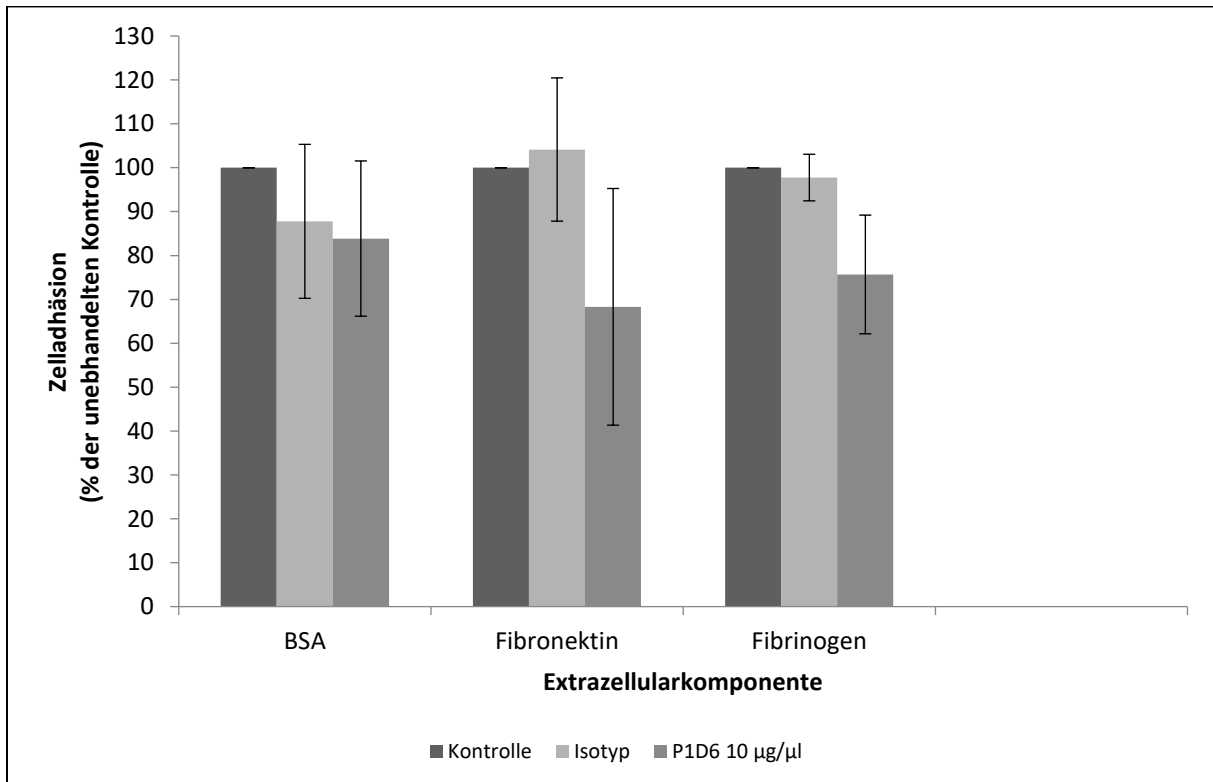


Abb. 19 Adhäsion der Zelllinie Caki-1 an Fibrinogen einer Konzentration 1 mg/ml

Dargestellt ist die Adhäsion der Zelllinie Caki-1 an die Extrazellulärkomponente Fibrinogen (1 mg/ml). Fibronectin (10 µg/ml) wurde hierbei als Positivkontrolle mitgeführt. Bezogen auf die Isotypenkontrolle (97%) sank die prozentuale Adhäsion nach Behandlung mit Integrin- α 5-Antikörpern (10 µg/ml) um 30%. Der mittels Student's t-test ermittelte p-Wert betrug $p = 0,075$ ($p > 0,05$). Es wurden Mittelwerte aus drei Versuchsdurchgängen gebildet ($n = 3$) und entsprechende Standardabweichungen vom Mittelwert gebildet.

Eine gesteigerte Reduktion des Adhäsionsverhaltens zeigte sich bei der Zelllinie CCF-RC1. Ausgehend von der Isotypenkontrolle (112%) sank die prozentuale Zelladhäsion an Fibrinogen auf 65% bezogen auf die Kontrolle. Die entspricht einer Differenz von 47% ($p > 0,05$, Abb. 20).

4. Ergebnisse

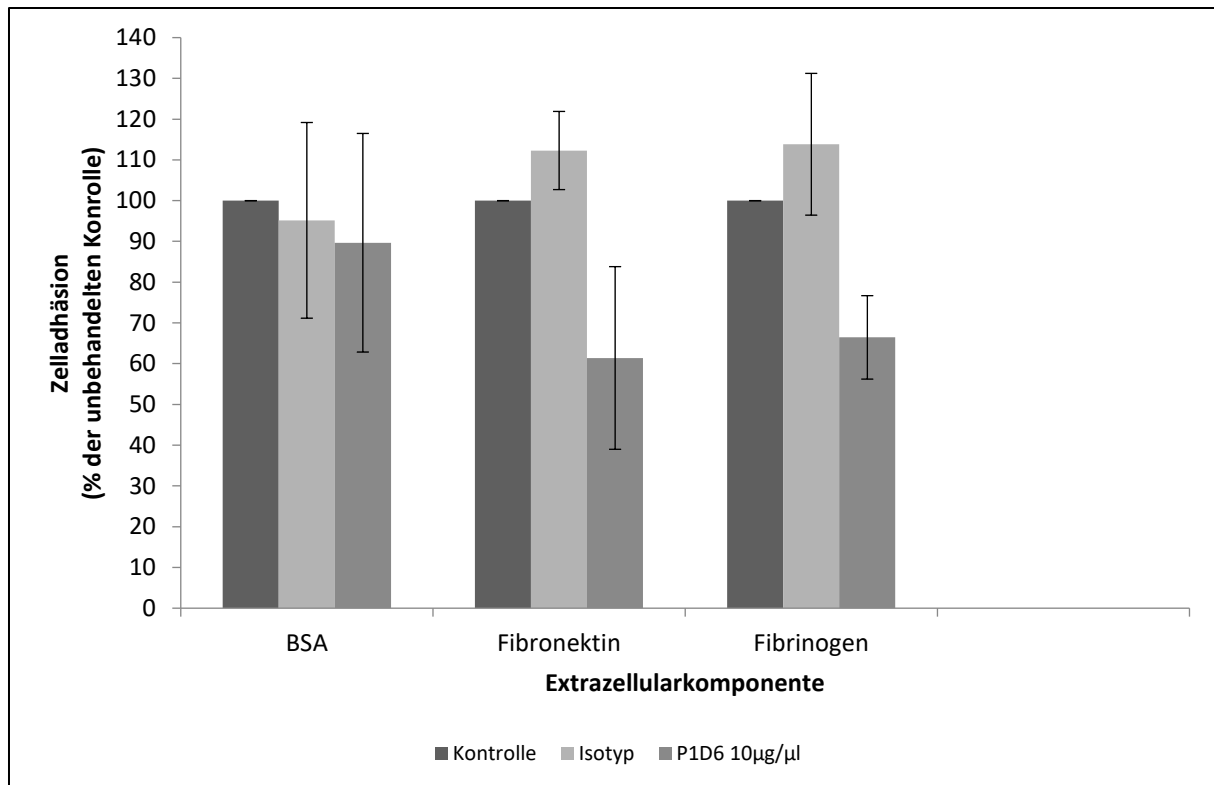


Abb. 20 Adhäsion der Zelllinie CCF-RC1 an Fibrinogen einer Konzentration 1 mg/ml

Dargestellt ist die Adhäsion der Zelllinie CCF-RC1 an die Extrazellulärmatrixkomponente Fibrinogen (1 mg/ml). Fibronektin (10 µg/ml) wurde hierbei als Positivkontrolle mitgeführt. Bezogen auf die Isotypenkontrolle (112%) sank die prozentuale Adhäsion nach Behandlung mit Integrin- α 5-Antikörpern (10 µg/ml) um 47%. Der mittels Student's t-test ermittelte p-Wert betrug $p = 0,082$. ($p > 0,05$). Es wurden Mittelwerte aus drei Versuchsdurchgängen gebildet ($n = 3$) und entsprechende Standardabweichungen vom Mittelwert gebildet.

Zusammengefasst konnte ein signifikanter Einfluss von Integrin- α 5 auf die Zelladhäsion an die EZM-Komponente Fibronektin gezeigt werden.

4.4 Immunzytochemischer Nachweis von Integrin- α 5

Immunzytochemische Färbungen von Integrin- α 5 wurden durchgeführt, um die Verteilung des Rezeptors auf der Zelloberfläche zu analysieren. Dies erfolgte mit zwei verschiedenen Verfahren. Zum einen wurden die Zellen direkt auf einem gekammerten Objektträger ausgesät und über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Zum anderen wurde der Zellrasen der Kulturflasche in Suspension gebracht und mittels Zytospin direkt auf einen Objektträger transferiert. Nach erster Methode bildeten die Zellen eine adhärenzte Zelloberfläche bei aktivem Stoffwechszustand. Bei zweiter Methode wurden die Zellen willkürlich gedreht auf dem Objektträger fixiert. Ziel war zu zeigen, ob Integrin- α 5 gleichmäßig auf der

4. Ergebnisse

Zelloberfläche exprimiert wird. Daraus sollte die Behandlung der Zellen mit P1D6 für die Westernblots abgeleitet werden.

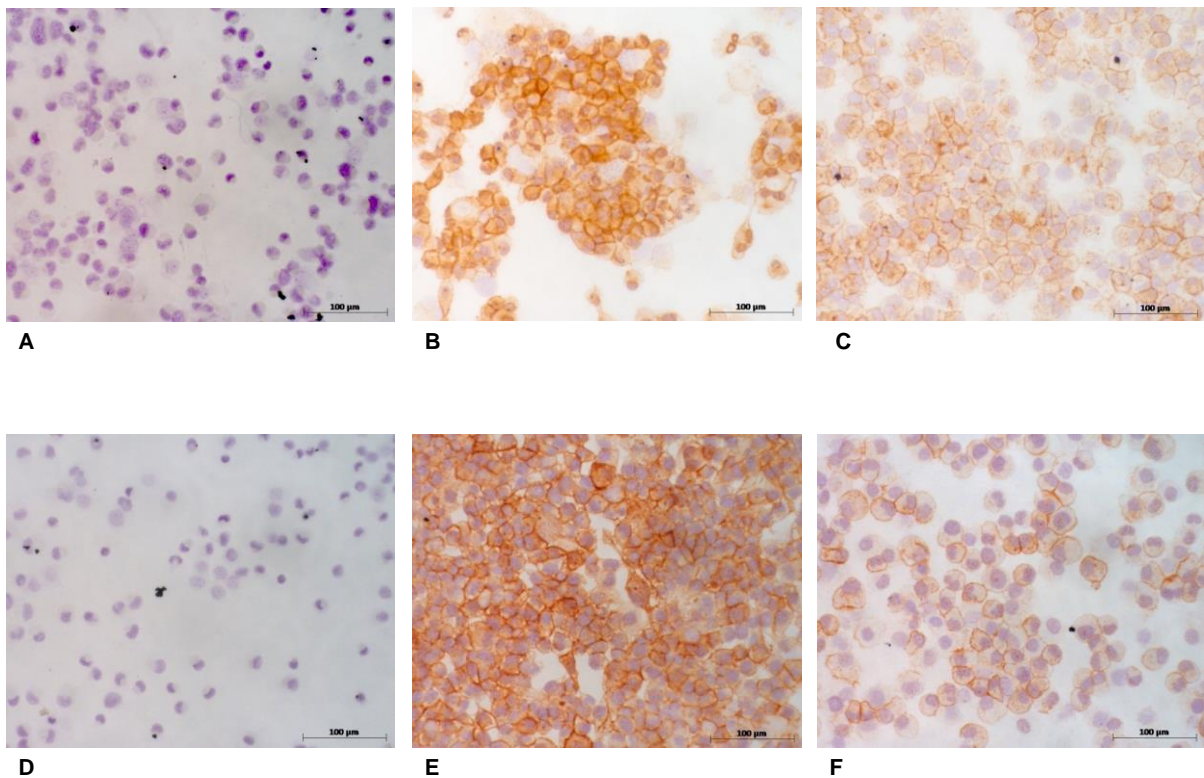


Abb. 21 Immunzytochemische Färbung von Integrin- α 5 auf Caki-1 und CCF-RC1

In der oberen Reihe (A, B, C) sind die Färbungen der Zellreihe Caki-1, in der unteren Reihe (D, E, F) Färbungen der Zellreihe CCF-RC1 in 20facher Vergrößerung dargestellt. B und E zeigen die Färbung von Integrin- α 5 auf ausgesäten Zellen, C und F zeigen Zellen, welche mittels Zytospin auf dem Objektträger fixiert wurden. Zu sehen ist bei den Bildern B, C, E und F eine membranständige braune Anfärbung von Integrin- α 5 auf der Zelloberfläche. Im Gegensatz zu den mechanisch auf den Objektträger übertragenen Zellen (C und F) ist das Oberflächenmolekül Integrin- α 5 bei den gesäten Zellen (B und E) stärker angefärbt (148).

Es konnte gezeigt werden, dass bei beiden Verfahren das Oberflächenmolekül Integrin- α 5 gleichmäßig nachgewiesen wurde. Bei Verwendung des Zytospinverfahrens ist ein schwächerer Färbefeffekt zu erkennen. Dennoch kann aus der Ähnlichkeit der Bilder geschlossen werden, dass Integrin- α 5 gleichmäßig auf der gesamten Zelloberfläche exprimiert wird. Besonders intensiv und damit stark exprimiert ist es allerdings an den Adhäsionspunkten zu anderen Zellen (Abb. 21).

Für die Vorbehandlung der Zellen mit P1D6 in Bezug auf Westernblot- Proteinanalysen bedeutet dies, dass die Zellen nicht für die Vorbehandlung mit P1D6 in Suspension gebracht werden müssen, sondern direkt auf dem Kulturgefäß behandelt werden können.

4.5 Einfluss von Integrin- α 5 auf die Signalkaskaden in Nierenkarzinomzellen

In oben genannten Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Blockade von Integrin- α 5 mittels eines spezifischen Antikörpers effektiv das Adhäsions- und Migrationsbestreben in Richtung der EZM-Komponente Fibronectin hemmt. Um zu zeigen, welche intrazellulären Stoffwechselfvorgänge durch diese Blockade involviert sind, wurden Westernblotuntersuchungen der Proteine Paxillin, SRC, SHC, FAK, ERK und AKT, sowie deren aktiven/phosphorylierten Formen durchgeführt. Auch sollte mit diesen Ergebnissen eine Erklärungsmöglichkeit für oben genannte Effekte auf molekularbiologischer Ebene geschaffen werden. Es wurden zwei Behandlungsgruppen miteinander verglichen: Stimulation mit Fibronectin (10 μ g/ml), Stimulation mit Fibronectin (10 μ g/ml) mit anschließender Integrin- α 5-Inhibition (P1D6 10 μ g/ml). Die Ergebnisse werden im Folgenden nach ihrer Abfolge im Outside-In-Signaling-Netzwerk in absteigender Reihenfolge dargelegt.

4.5.1 Einfluss auf Paxillin

Da Integrine selbst keine intrinsische Enzymaktivität besitzen, werden bei extrazellulärer Ligandenbindung zunächst einige Adapterproteine akquiriert. Unter diesen spielt Paxillin als Ausgangspunkt der Mobilitätsmoderation über P¹³⁰CAS/RAC eine entscheidende Rolle (128, 137).

Bei der Zelllinie Caki-1 zeigte sich zwischen beiden Behandlungsgruppen eine tendenzielle Steigerung. Von ausgehend 104% bzw. 125% bei Paxillin bzw. pPaxillin kam es unter Vorbehandlung mit Antikörpern zu einer verstärkten Expression bzw. Aktivität um 27% bzw. 33% bei Paxillin (Abb. 22).

4. Ergebnisse

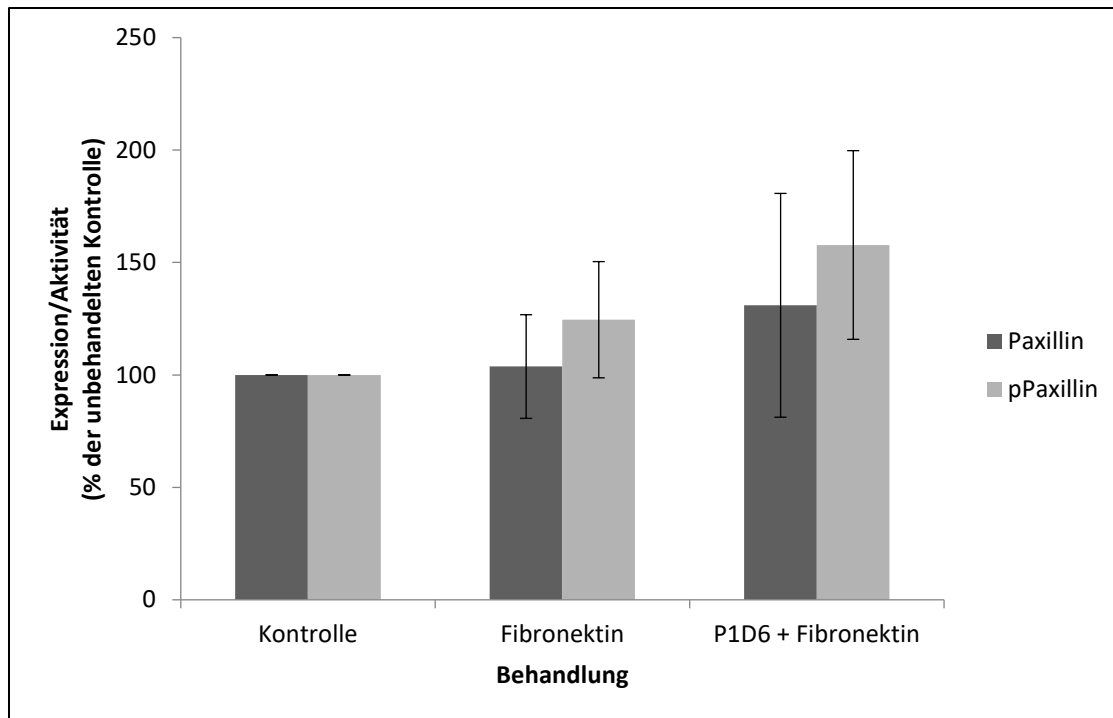


Abb. 22 Einfluss von Fibronectin und Integrin- α 5-Hemmung auf die Expression und Aktivität von Paxillin der Zelllinie Caki-1

Sowohl die Expression als auch die Aktivität zeigten eine Steigerung um 27% bzw. 33% (Paxillin bzw. pPaxillin) nach Fibronectin bzw. Fibronectin und P1D6 Behandlung ($p = 0,32$ Paxillin, $p = 0,15$ pPaxillin). Dargestellt sind der Mittelwert aus $n = 3$ Werten, sowie die Standardabweichungen der Mittelwerte. Die mittels AlphaView® ermittelte Pixeldichte der einzelnen Banden wurde jeweils auf die analoge β -Actin Bande der unbehandelten Kontrolle bezogen und in Prozent dargestellt.

Bei der Zelllinie CCF-RC1 zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Die p-Werte betragen hier $p = 0,89$ für Paxillin und $p = 0,87$ für pPaxillin. Mit 107% bzw. 109% (Fibronectin bzw. Antikörperbehandlung) für Paxillin und 97% bzw. 98% (Fibronectin bzw. Antikörperbehandlung) für pPaxillin konnte kein eindeutiger Trend in der Expression nach der Behandlung identifiziert werden (Abb. 23).

4. Ergebnisse

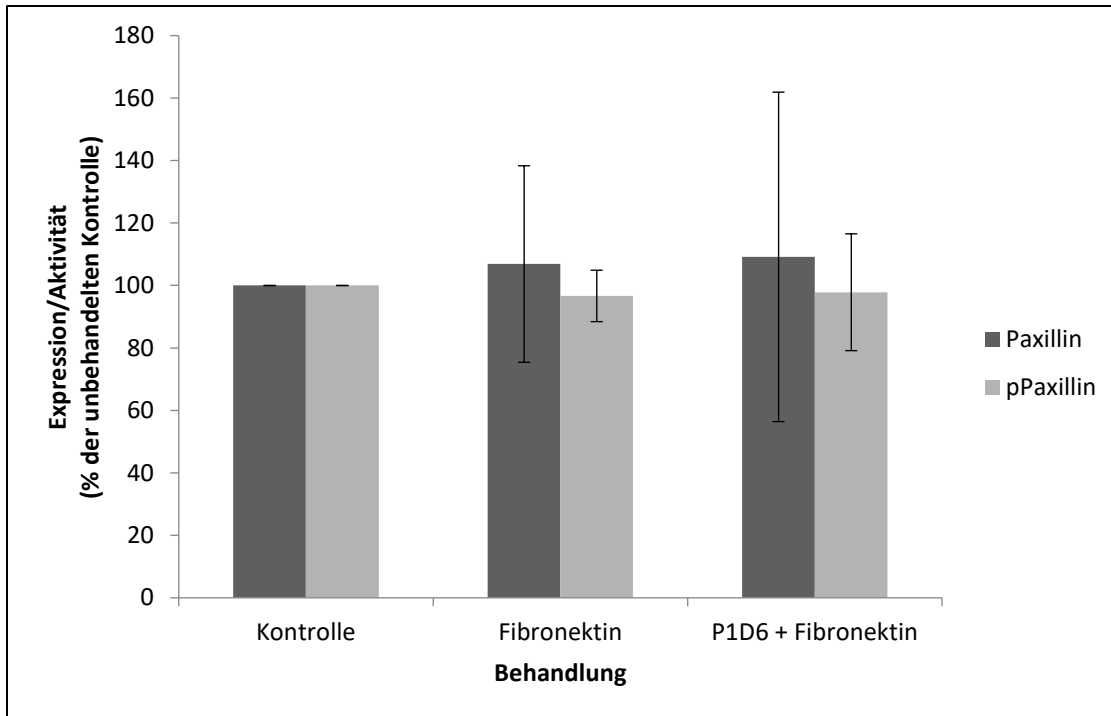


Abb. 23 Einfluss von Fibronectin und Integrin- α 5-Hemmung auf die Expression und Aktivität von Paxillin der Zelllinie CCF-RC1

Sowohl die Expression als auch die Aktivität von Paxillin zeigte nur eine geringfügige Abweichung von der unbehandelten Kontrolle um 7% und 9% bei Paxillin bzw. 3% und 2% bei pPaxillin ($p = 0,89$ Paxillin bzw. $p = 0,87$ pPaxillin). Dargestellt sind der Mittelwert aus $n = 3$ Werten, sowie die Standardabweichungen der Mittelwerte. Die mittels AlphaView® ermittelte Pixeldichte der einzelnen Banden wurde jeweils auf die analoge β -Actin Bande bezogen und in Prozent der unbehandelten Kontrolle dargestellt.

4.5.2 Einfluss auf FAK

Neben Paxillin als Adapterprotein rekrutiert das Integrin- α 5 β 1 die fokale Adhäsionskinase FAK. In der Zelllinie Caki-1 kam es bei Vorbehandlung mit Fibronectin zunächst zu einer Reduktion der Expression bzw. Aktivität (89% FAK, 76% pFAK). Bei Zellen, welche mit Fibronectin und Integrin- α 5-blockierendem Antikörper vorbehandelt wurden, zeigte sich eine im Vergleich zur Fibronectinbehandlung verstärkte Expression bzw. Aktivität von FAK (98% FAK, bzw. 97% pFAK; $p = 0,65$ FAK, $p = 0,48$ pFAK, Abb. 24).

4. Ergebnisse

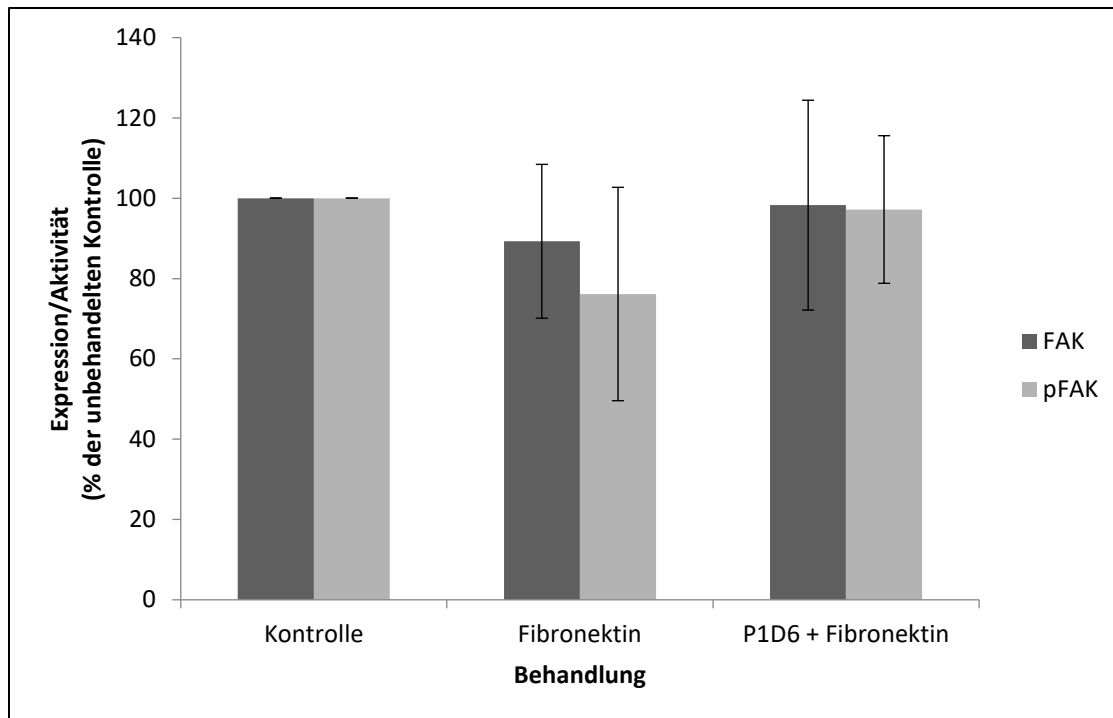


Abb. 24 Einfluss von Fibronectin und Integrin- α 5-Hemmung auf die Expression und Aktivität von FAK bei der Zelllinie Caki-1

Bei Vorbehandlung mit Fibronectin kam es zunächst zu einer Expressionsreduktion auf 89% bzw. Aktivitätsreduktion auf 76%, welche sich bei Zellen mit Vorbehandlung mit Fibronectin und Integrin- α 5-blockierenden Antikörpern mit 98% bzw. 97% bezogen auf die unbehandelte Kontrolle rückläufig zeigt ($p = 0,65$ FAK, $p = 0,48$ pFAK). Dargestellt sind der Mittelwert aus $n = 3$ Werten, sowie die Standardabweichungen der Mittelwerte. Die mittels AlphaView® ermittelte Pixeldichte der einzelnen Banden wurde jeweils auf die analoge β -Actin Bande der unbehandelten Kontrolle bezogen und in Prozent dargestellt.

Die Zelllinie CCF-RC1 wies unter Stimulation mit Fibronectin einen Anstieg der Expression bzw. Aktivität auf 110% bzw. 120% (FAK bzw. pFAK) bezogen auf die unbehandelten Zellen auf. Nach Inhibition des Integrins zeigte sich eine Reduktion auf 95% bzw. 95% (FAK bzw. pFAK) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ($p = 0,3$ FAK bzw. $p = 0,2$ pFAK; Abb. 25).

4. Ergebnisse

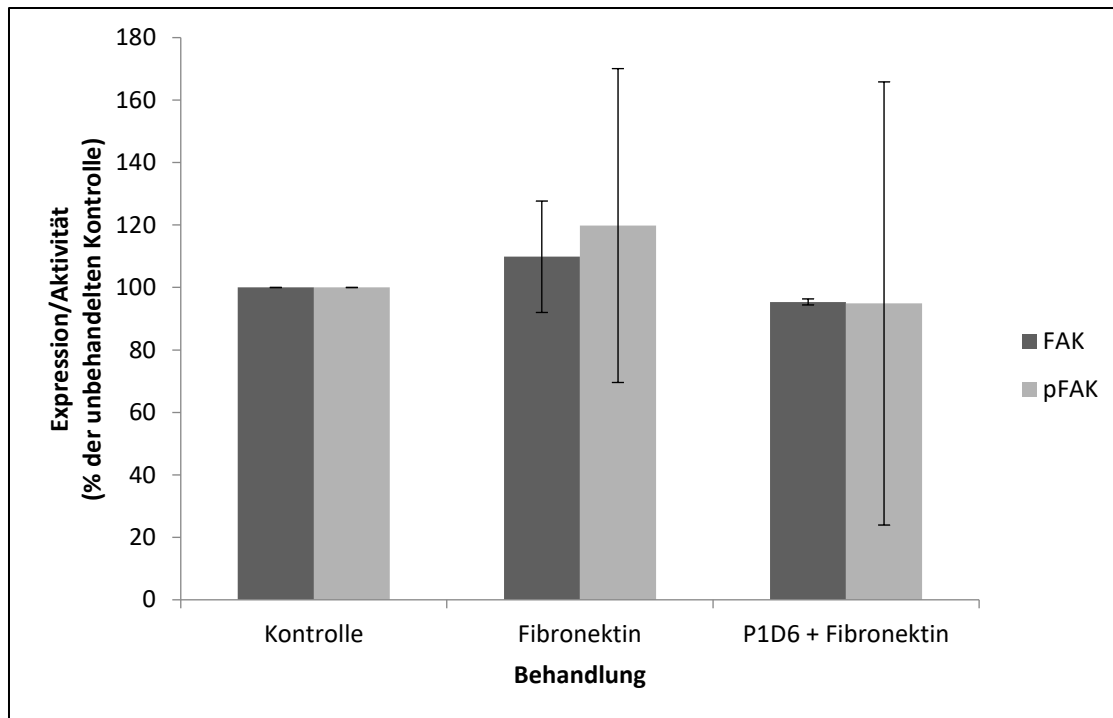


Abb. 25 Einfluss von Fibronectin und Integrin- α 5-Hemmung auf die Expression und Aktivität von FAK bei der Zelllinie CCF-RC1

Unter Vorbehandlung mit Fibronectin kam es zu einer verstärkten Expression bzw. Aktivität auf 110% FAK bzw. 120% pFAK. Bei Vorbehandlung mit Fibronectin und Antikörpern gegen Integrin- α 5 zeigte sich bezogen auf die Kontrollgruppe eine verminderte Expression bzw. Aktivität von 95% bei FAK und 95% bei pFAK ($p = 0,3$ FAK, $p = 0,2$ pFAK). Dargestellt sind der Mittelwert aus $n = 3$ Werten, sowie die Standardabweichungen der Mittelwerte. Die große Standardabweichung der Mittelwerte bei der Aktivität lässt sich durch einen Ausreißer der Messwerte erklären. Die mittels AlphaView® ermittelte Pixeldichte der einzelnen Banden wurde jeweils auf die analoge β -Actin Bande der unbehandelten Kontrolle bezogen und in Prozent dargestellt.

4.5.3 Einfluss auf SRC

Die an Integrin- α 5 angelagerte Proteinkinase FAK rekrutiert nach Autoaktivierung durch Phosphorylierung das Protein SRC. Es dient als Ausgangspunkt des ERK/MAP-Kinase- und des PI3K/AKT-Kinase-Signalwegs. Beide Signalwege sind essenziell für die Proliferation, Differenzierung und das Überleben der Zelle (136).

Bei der unphosphorylierten Variante von SRC zeigte sich bei Fibronectinbehandlung der Caki1-Zellen ein Expressionsabfall um 7% auf 93 %, welcher bei Inhibition von Integrin- α 5 und Fibronectinbehandlung mit einem Wert von 87 % noch stärker ausgeprägt war ($p = 0,22$). Bei pSRC kam es unter Fibronectinvorbehandlung zunächst zu einer leicht verstärkten Aktivität auf 110% gegenüber den unbehandelten

4. Ergebnisse

Zellen. Durch Vorbehandlung der Zellen mit Fibronectin und spezifischem Integrin- α 5-blockierendem Antikörper zeigte sich eine Aktivität von 89% bezogen auf die Kontrolle ($p = 0,16$; Abb. 26).

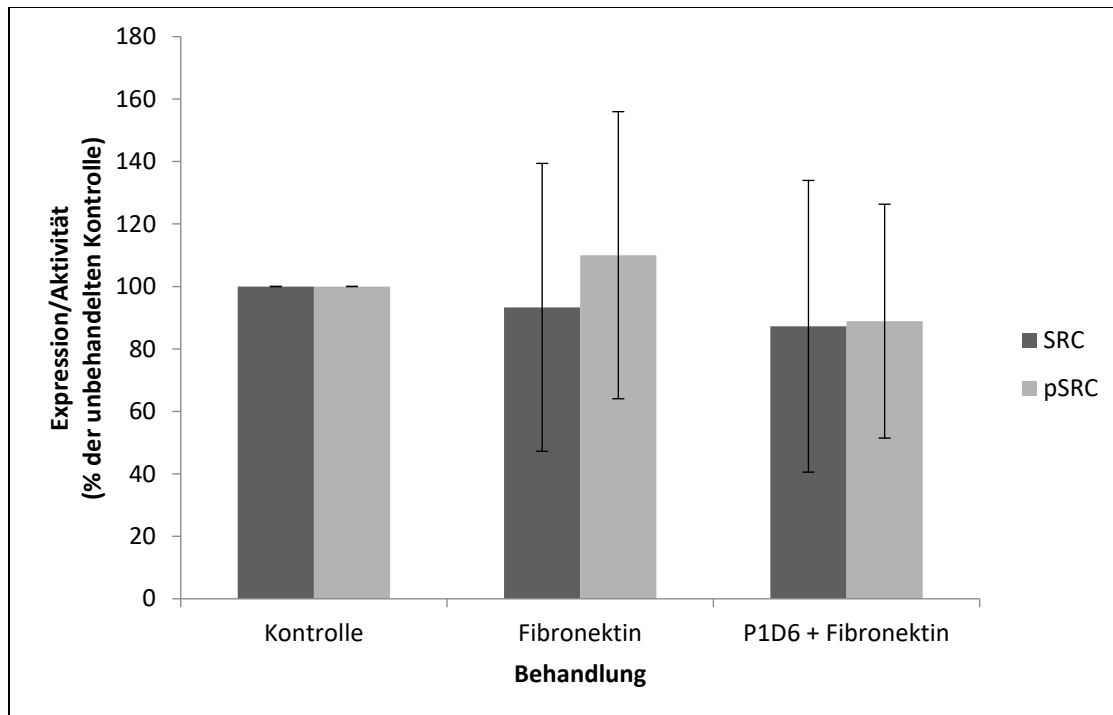


Abb. 26 Einfluss von Fibronectin und Integrin- α 5-Hemmung auf die Expression und Aktivität von SRC bei der Zelllinie Caki-1

Für SRC konnte eine fallende Tendenz des Expressionsniveaus über beide Behandlungsformen beobachtet werden (93% Fibronectin und 87% Antikörperbehandlung, $p = 0,22$). Für pSRC wies das Aktivitätsniveau 110% gegenüber der unbehandelten Kontrolle auf. Unter Integrin- α 5-Antikörper- und Fibronectinbehandlung zeigte sich dieses fallend auf 89% gegenüber der unbehandelten Kontrolle ($p = 0,16$). Dargestellt sind der Mittelwert aus $n = 3$ Werten, sowie die Standardabweichungen der Mittelwerte. Die mittels AlphaView® ermittelte Pixeldichte der einzelnen Banden wurde jeweils auf die analoge β -Actin Bande der unbehandelten Kontrolle bezogen und in Prozent dargestellt.

Inverse Effekte zeigten sich bei der Zelllinie CCF-RC1. Bei diesen Zellen kam es durch Fibronectinzugabe in den Ansatz zu einer verstärkten Expression (120%). Bei Zugabe von Integrin- α 5-blockierendem Antikörper und Fibronectin fiel das Expressionsniveau auf 96% gegenüber der unbehandelten Kontrollansätze ab ($p = 0,13$). Die SRC-Aktivität reduzierte sich durch Behandlung mit Fibronectin auf 94% und durch Behandlung mit Integrin- α 5-blockierendem Antikörper und Fibronectin auf 67% ($p = 0,13$; Abb. 27).

4. Ergebnisse

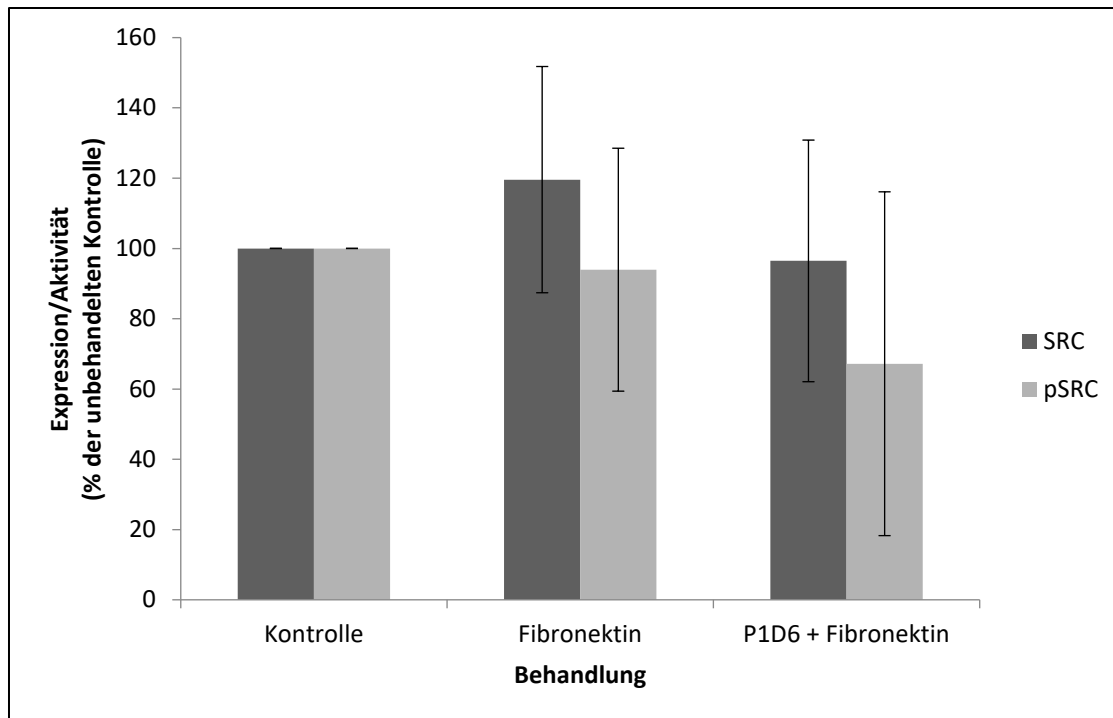


Abb. 27 Einfluss von Fibronectin und Integrin- α 5-Hemmung auf die Expression und Aktivität von SRC bei der Zelllinie CCF-RC1

Es zeigte sich ein zur Zelllinie Caki-1 inverses Ergebnis. Bei SRC kam es zunächst durch Fibronectinbehandlung zu einer verstärkten Expression auf 120%, welche unter Integrin- α 5-blockierenden Antikörper- und Fibronectinbehandlung auf 96% abgeschwächt wurde ($p = 0,13$). Bei beiden Behandlungsformen kam es zu einer verminderten SRC-Aktivität. Von ausgehend 94% (Fibronectin) betrug die Signalstärke 67% (Integrin- α 5-blockierende Antikörper und Fibronectin, $p = 0,13$). Dargestellt sind der Mittelwert aus $n = 3$ Werten, sowie die Standardabweichungen der Mittelwerte. Die mittels AlphaView® ermittelte Pixeldichte der einzelnen Banden wurde jeweils auf die analoge β -Actin Bande der unbehandelten Kontrolle bezogen und in Prozent dargestellt.

4.5.4 Einfluss auf SHC

Wird SRC unabhängig von FAK aktiviert, führt dies über die Phosphorylierung von SHC zur Aktivierung des ERK/MAPK-Weges (128, 137). Für das Protein SHC in der Zelllinie Caki-1 lag mit einem Expressionslevel von 103% bei Fibronectinbehandlung ein geringfügig erhöhter Wert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle vor. Bei Vorbehandlung des Zellansatzes mit Fibronectin und Integrin- α 5-blockierendem Antikörper zeigte sich mit 95% nur eine kleine Expressionsdifferenz zwischen beiden Behandlungsgruppen ($p = 0,07$). Bei der Aktivität von SHC zeigte sich mit Werten von 105% (Fibronectin) und 99% (Fibronectin und Integrin- α 5-blockierender Antikörper) ein vergleichbares Ergebnis ($p = 0,08$; Abb. 28).

4. Ergebnisse

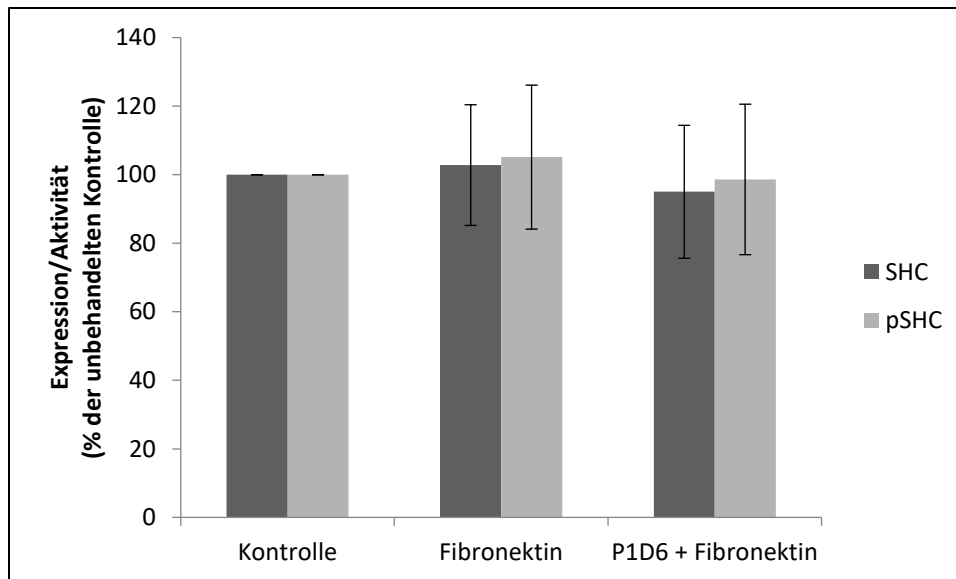


Abb. 28 Einfluss von Fibronectin und Integrin- α 5-Hemmung auf die Expression und Aktivität von SHC bei der Zelllinie Caki-1

Es kam bei beiden Proteinformen zunächst zu einer leichten Expressions- bzw. Aktivitätssteigerung (103% bzw. 105%). Für die mit Integrin- α 5-blockierenden Antikörpern und Fibronectin behandelten Zellen lag das Expressionsniveau bei 95% und das Aktivitätsniveau bei 99% ($p = 0,077$ SHC, $p = 0,08$ pSHC). Dargestellt sind der Mittelwert aus $n = 3$ Werten, sowie die Standardabweichungen der Mittelwerte. Die mittels AlphaView® ermittelte Pixeldichte der einzelnen Banden wurde jeweils auf die analoge β -Actin Bande der unbehandelten Kontrolle bezogen und in Prozent dargestellt.

SHC in der Zelllinie CCF-RC1 zeigte mit Expressionsleveln von 99% (Fibronectin) und 89% (zusätzliche Integrin- α 5-blockierende Antikörperbehandlung) eine leichte Expressionsreduktion ($p = 0,10$). Bei der Aktivität von SHC zeigten sich mit Werten von 104% (Fibronectin) und 102% (zusätzliche Integrin- α 5-blockierende Antikörperbehandlung) minimal veränderte Werte ($p = 0,86$, Abb. 29).

4. Ergebnisse

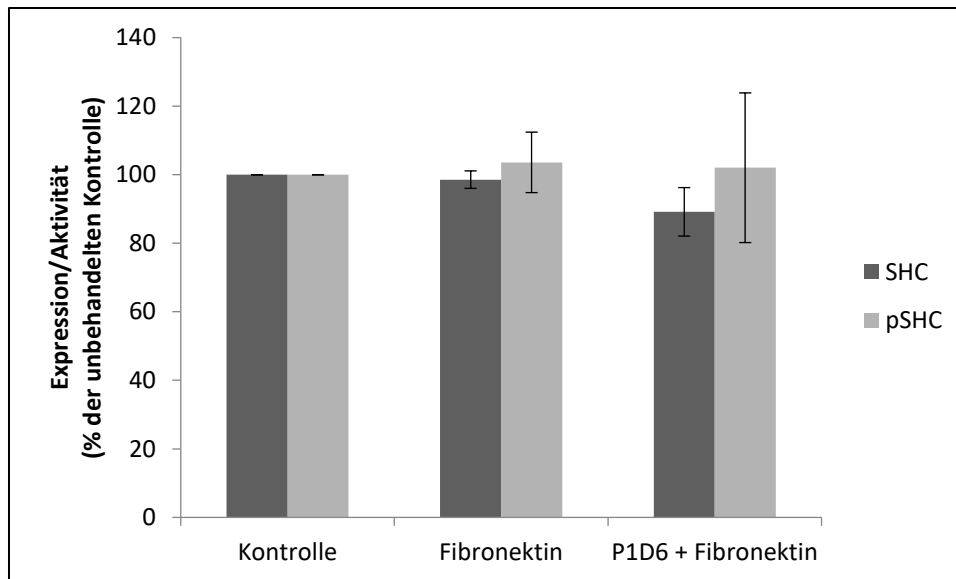


Abb. 29 Einfluss von Fibronectin und Integrin- α 5-Hemmung auf die Expression und Aktivität von SHC bei der Zelllinie CCF-RC1

Mit einer Expression von 99% und 89% und einer Aktivität von 102% und 104% lagen nur gering veränderte Werte gegenüber der unbehandelten Kontrolle bei den verschiedenen Behandlungsformen vor ($p = 0,10$ SHC, $p = 0,86$ pSHC). Dargestellt sind der Mittelwert aus $n = 3$ Werten, sowie die Standardabweichungen der Mittelwerte. Die mittels AlphaView® ermittelte Pixeldichte der einzelnen Banden wurde jeweils auf die analoge β -Actin Bande der unbehandelten Kontrolle bezogen und in Prozent dargestellt.

4.4.5 Einfluss auf AKT

Als großes Downstreamnetzwerk wird der PI3K/AKT-Kinase Weg durch die Aktivierung von SRC angesteuert. In der Zelllinie Caki-1 lag mit 107% nach Aktivierung durch Fibronectin gegenüber der Kontrolle kein Unterschied der Gesamt-AKT-Menge vor. Auch nach zusätzlicher Integrin- α 5-blockierender Antikörperbehandlung blieb das Messergebnis mit 107% konstant ($p = 1,0$).

Bei der an S473 phosphorylierten Form hingegen kam es nach Fibronectinbehandlung zu einer Aktivitätssteigerung von AKT auf 175% der unbehandelten Zellen. Nach Behandlung mit Integrin- α 5-blockierenden Antikörpern und Fibronectin reduzierte sich die Aktivität auf 82% ($p = 0,02$; Abb. 30).

4. Ergebnisse

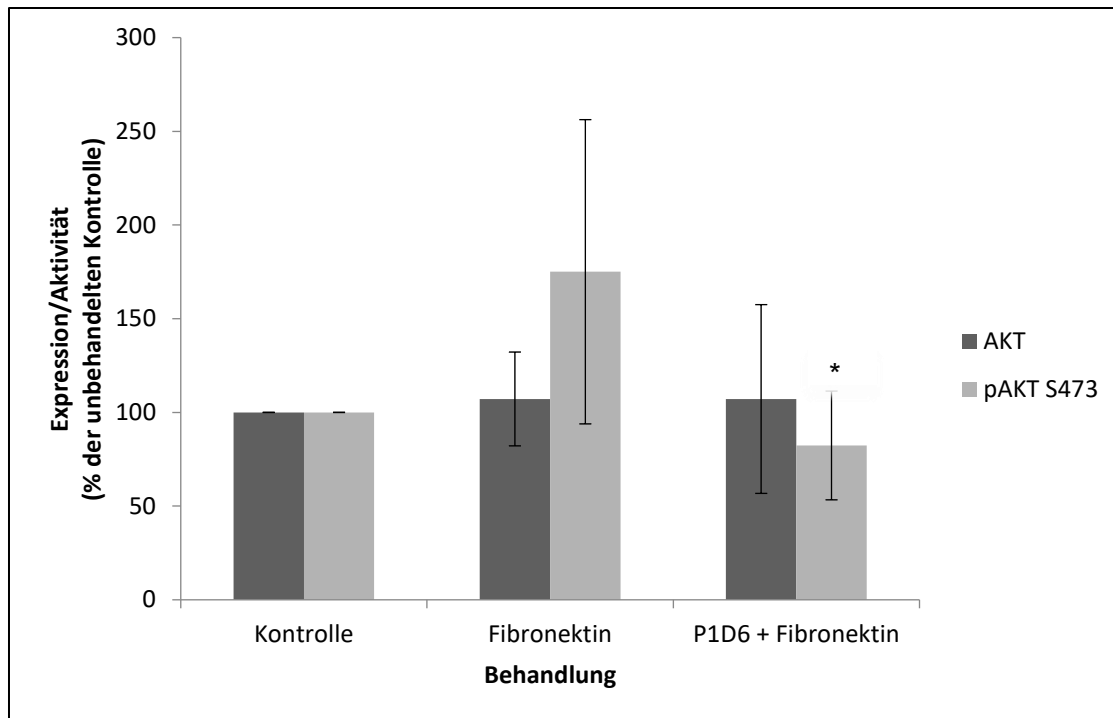


Abb. 30 Einfluss von Fibronectin und Integrin- α 5-Hemmung auf die Expression und Aktivität von AKT bei der Zelllinie Caki-1

Die Expression zeigte mit Werten von 107% im Vergleich zur Kontrolle ein bei beiden Behandlungsgruppen (Fibronectin und Integrin- α 5-blockierende Antikörper mit Fibronectin) stabiles Messergebnis ($p = 1,0$). Bei der an S473 phosphorylierten Form zeigte sich unter Vorbehandlung mit Fibronectin eine Aktivitätssteigerung auf 175%, bei Vorbehandlung mit P1D6-Antikörpern und Fibronectin eine Aktivitätsreduktion auf 82,4% ($p = 0,02$). Dargestellt sind der Mittelwert aus $n = 3$ Werten, sowie die Standardabweichungen der Mittelwerte. Die mittels AlphaView® ermittelte Pixeldichte der einzelnen Banden wurde jeweils auf die analoge β -Actin Bande der unbehandelten Kontrolle bezogen und in Prozent dargestellt (148).

Mit 103% bzw. 102% (mit Fibronectin vorbehandelt bzw. zusätzlich mit Antikörper behandelt) unterschied sich die Expression von AKT bei der Zelllinie CCF-RC1 in den einzelnen Behandlungsgruppen nicht ($p = 0,88$). Die Aktivität von pAKT S473 stieg durch Vorbehandlung der Zellen mit Fibronectin auf 117% an. Bei zusätzlicher Gabe von P1D6 als Integrin- α 5-Inhibitor fiel die Aktivität der Zellen auf 111% der unbehandelten Zellen ab ($p = 0,18$; Abb. 31).

4. Ergebnisse

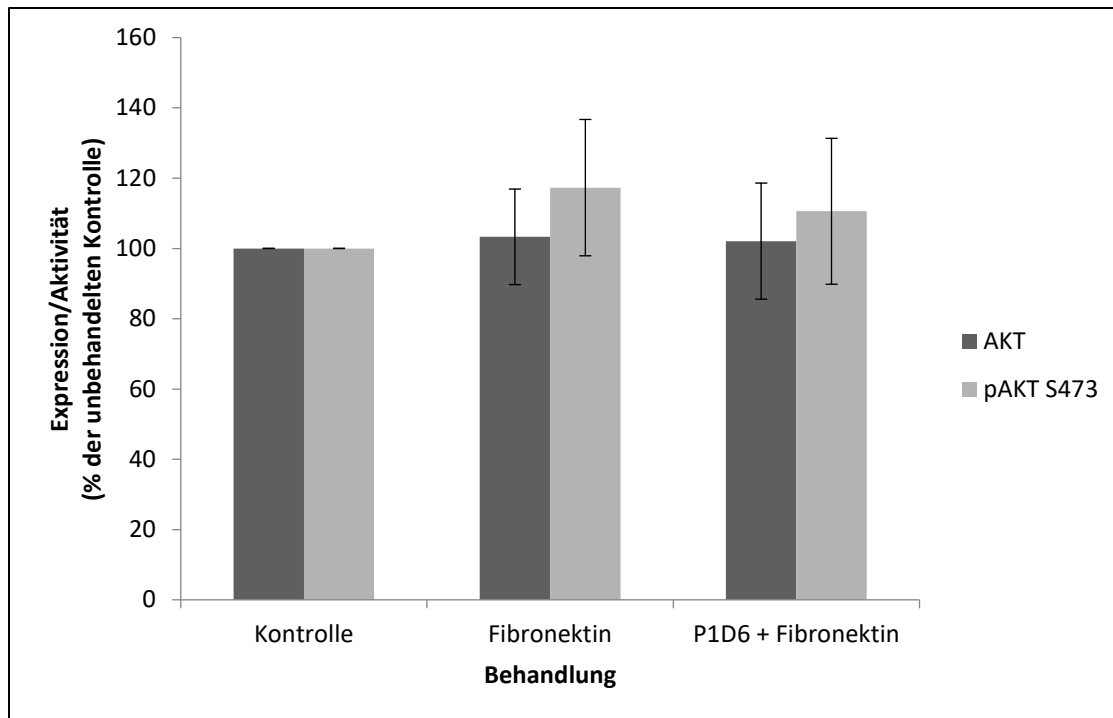


Abb. 31 Einfluss von Fibronectin und Integrin- α 5-Hemmung auf die Expression und Aktivität von AKT bei der Zelllinie CCF-RC1

Die Expression von AKT wies mit 103% bzw. 103% (Fibronectin bzw. P1D6 und Fibronectin vorbehandelt) keine Veränderung gegenüber der unbehandelten Kontrolle auf ($p = 0,88$). pAKT S473 zeigte mit Werten von 117% und 111% (Fibronectin bzw. P1D6 und Fibronectin vorbehandelt) keine Aktivitätsänderungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle auf ($p = 0,18$). Dargestellt sind der Mittelwert aus $n = 3$ Werten, sowie die Standardabweichungen der Mittelwerte. Die mittels AlphaView® ermittelte Pixeldichte der einzelnen Banden wurde jeweils auf die analoge β -Actin Bande der unbehandelten Kontrolle bezogen und in Prozent dargestellt (148).

Darüber hinaus wurde die Aktivität von pAKT T308 analog untersucht. Bei sehr großer Varianz der Messergebnisse bei zu wenigen aussagekräftige Messdaten werden die Messergebnisse in dieser Arbeit nicht dargestellt.

4.4.6 Einfluss auf ERK

Über Aktivierung von GRB2 und RAS durch pSRC kommt es im Verlauf zur Aktivierung der Proteinkinase ERK aus dem MAP-Kinase Signalnetzwerk. Als wichtiger Vertreter dieses Signalweges und Mediator der Zellproliferation und -differenzierung spielt die Aktivität dieser Kinase eine entscheidende Rolle im (Über-)lebensprozess einer Zelle (128). Die Zelllinie Caki-1 zeigte mit einer Expression von 101% nach Fibronektingabe keine Signalsteigerung gegenüber dem unbehandelten Kontrollansatz. Nach zusätzlicher Behandlung mit P1D6 steigerte sich die Signalstärke um 12% auf 113% ($p = 0,03$) der unbehandelten Kontrolle. Mit Werten von 145% und 143% (Fibronectin

4. Ergebnisse

vorbehandelt bzw. zusätzlich mit P1D6 vorbehandelt) verstärkte sich die Aktivität gegenüber der unbehandelten Kontrolle ($p = 0,67$, Abb. 32).

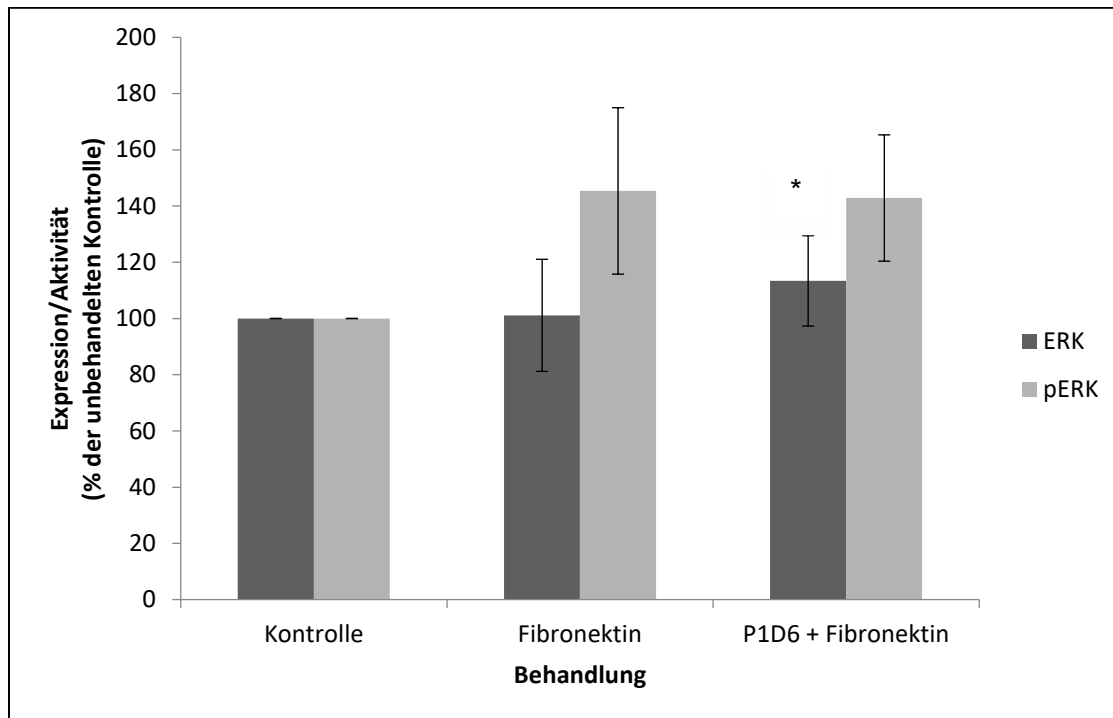


Abb. 32 Einfluss von Fibronectin und Integrin- α 5-Hemmung auf die Expression und Aktivität von ERK bei der Zelllinie Caki-1

Durch die Behandlung der Caki-1-Zellen mit Fibronectin bzw. zusätzlich P1D6-Antikörpern verstärkte sich die ERK-Expression der Zellen auf 101% bzw. 113% ($p = 0,03$). Die Aktivität von ERK wird durch Behandlung mit Fibronectin bzw. zusätzlich P1D6 auf 145% bzw. 143% angehoben ($p = 0,67$). Dargestellt sind der Mittelwert aus $n = 3$ Werten, sowie die Standardabweichungen der Mittelwerte. Die mittels AlphaView® ermittelte Pixeldichte der einzelnen Banden wurde jeweils auf die analoge β -Actin Bande der unbehandelten Kontrolle bezogen und in Prozent dargestellt (148).

Bei der Zelllinie CCF-RC1 änderte sich nach Fibronectinbehandlung mit 100% der unbehandelten Kontrolle das Expressionsniveau nicht. Mit 89% konnte durch Behandlung mittels P1D6 und Fibronectin die Expression um 11% gesenkt werden ($p = 0,05$). Diese Tendenz ergab sich auch für die Aktivität von ERK in der Zelllinie CCF-RC1. Durch Vorbehandlung mit Fibronectin schwächte sich die Aktivität um 9% auf 91% der unbehandelten Kontrolle ab. Durch zusätzliche P1D6-Behandlung verstärkte sich der Aktivitätsverlust auf 61% der unbehandelten Kontrolle ($p = 0,27$; Abb. 33).

4. Ergebnisse

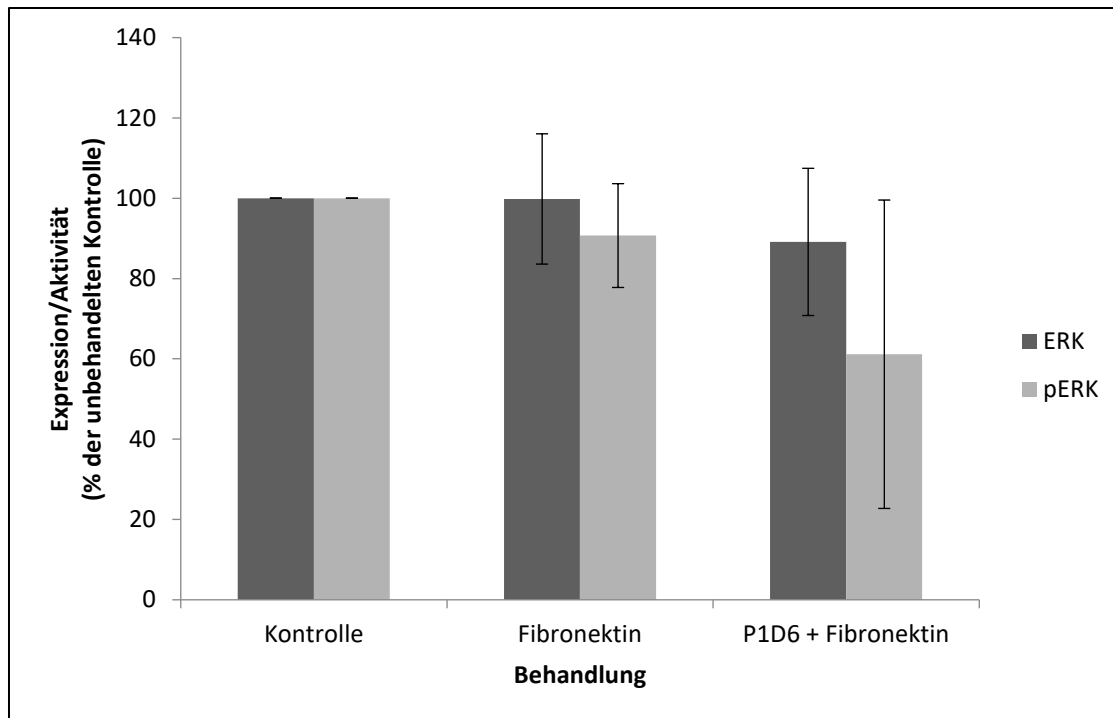


Abb. 33 Einfluss von Fibronectin und Integrin- α 5-Hemmung auf die Expression und Aktivität von ERK bei der Zelllinie CCF-RC1

Sowohl für die Expression als auch für die Aktivität von ERK zeigte sich ein tendenzieller Einfluss durch die Behandlung der Zellen mit P1D6-Antikörpern und Fibronectin. Bei der Expression wurde eine Signalreduktion von 11% ($p = 0,05$), bei der Aktivität von 30% der unbehandelten Kontrolle zwischen beiden Behandlungsgruppen aufgezeigt ($p = 0,27$). Dargestellt sind der Mittelwert aus $n = 3$ Werten, sowie die Standardabweichungen der Mittelwerte. Die mittels AlphaView® ermittelte Pixeldichte der einzelnen Banden wurde jeweils auf die analoge β -Actin Bande der unbehandelten Kontrolle bezogen und in Prozent dargestellt (148).

4.6 Einfluss von Integrin- α 5 auf die Zellvitalität

In den Westernblotuntersuchungen konnte eine gewisse Einflussnahme auf bestimmte Signalwege festgestellt werden. So war durch Behandlung der Zellen mit Anti-Integrin- α 5-Antikörpern ein Einfluss auf den AKT-Signalweg in Caki-1, sowie ein Einfluss auf den ERK 1/2 Signalweg in CCF-RC1 zu erkennen. Sowohl AKT, als auch ERK 1/2 stellen wichtige Stationen im Signalweg zur Proliferationsanregung dar (175). Mittels GloMax-Proliferationsassay der Firma Promega® wurde die Proliferation zwischen mit Fibronectin behandelten und zusätzlich mit Anti-Integrin- α 5-Antikörper behandelten Zellen verglichen. Bezugspunkt war der jeweils auf 1 gesetzte Zeitpunkt $t(0)$. In gleichem Versuchsaufbau wurde parallel die Zellzytotoxizität der verwendeten

4. Ergebnisse

Reagenzien erhoben. Ebenso wurde hierbei der zytotoxische Effekt von Fibronectin, sowie von Anti-Integrin- α 5-Antikörper auf die beiden Zellreihen untersucht.

Bei den Nierenkarzinomzellen der Zelllinie Caki-1 konnte eine kontinuierliche Zunahme der Zellproliferation über einen Zeitraum von 400 Minuten gezeigt werden. Bei der Zelllinie Caki-1 steigerte sich das Lumineszenzsignal in der Kontrollgruppe um 39%, in den anderen beiden Interventionsgruppen um 32% (Fibronectin) bzw. 33% (P1D6) in Bezug zum Zeitpunkt 0 (Abb. 34).

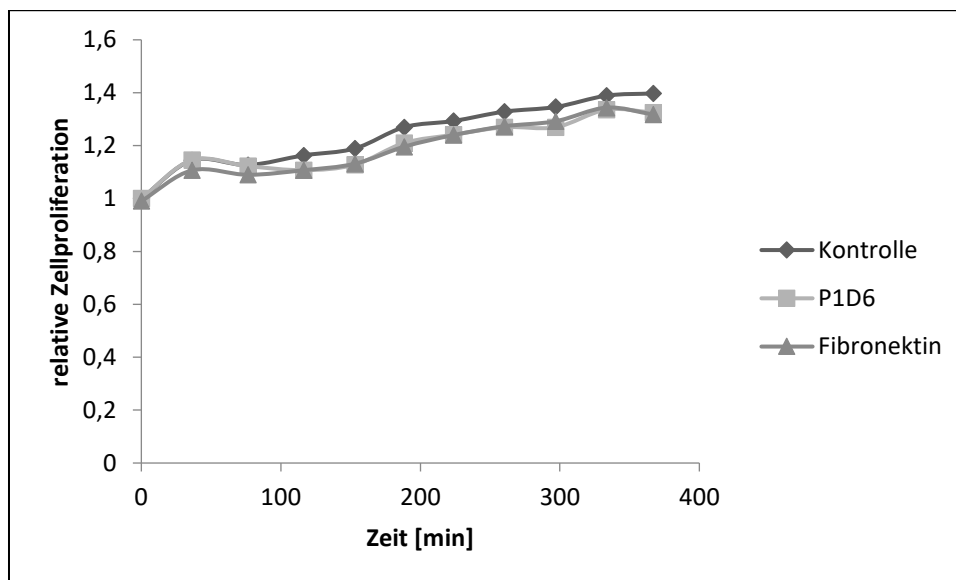


Abb. 34 Proliferation der Zelllinie Caki-1 bei unbehandelten und mit Fibronectin oder Integrin- α 5-Antikörper behandelten Zellen

Dargestellt ist die Zunahme des Lumineszenzsignals der Zellreihe Caki-1 in Bezug auf die Werte der Kontrolle zum Zeitpunkt $t = 0$. Es konnten keine Proliferationsunterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen dargelegt werden ($p > 0,05$). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus $n = 3$ Versuchsreihen. Aus Übersichtsgründen werden die Standardabweichungen der Mittelwerte nicht aufgezeigt. Der Mittelwert aller Standardabweichungen ergab für die Kontrolle 0,13, für P1D6 0,18 und für Fibronectin 0,14.

Für CCF-RC1 zeigte sich ein ähnliches Bild. Auch hier war eine kontinuierliche Lumineszenzzunahme zu erkennen. Die Kontrolle legte hierbei um 57% zu. Die mit Fibronectin behandelten Zellen steigerten sich um 56%, die mit Anti Integrin- α 5 Antikörper behandelten Zellen um 54% (Abb. 35). Schlussfolgernd unterschieden sich unter Berücksichtigung der Standardabweichungen vom Mittelwert die einzelnen Behandlungsgruppen nicht.

4. Ergebnisse

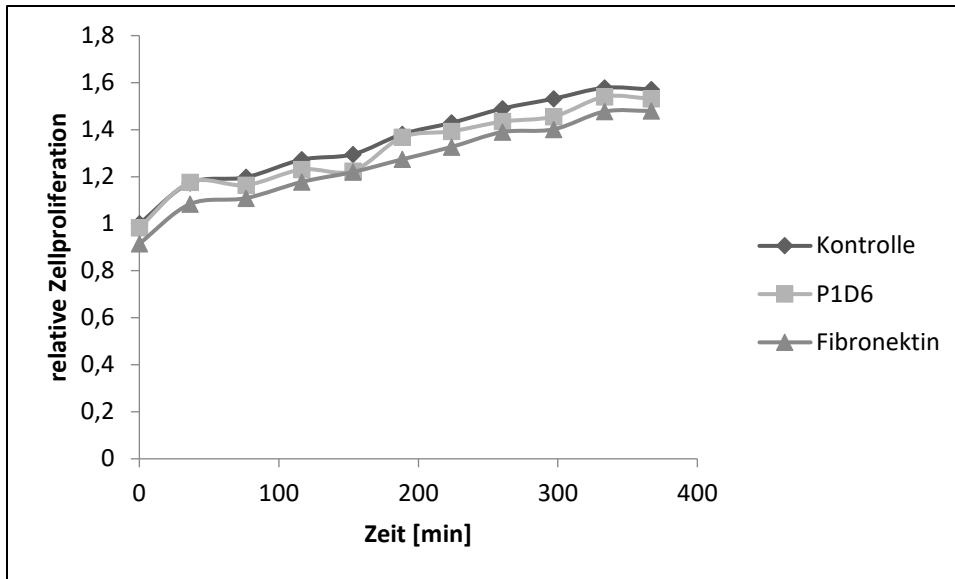


Abb. 35 Proliferation der Zelllinie CCF-RC1 bei unbehandelten und mit Fibronectin oder Integrin- α 5-Antikörper behandelten Zellen

Dargestellt ist die Zunahme des Lumineszenzsignals der Zellreihe CCF-RC1 in Bezug auf die Werte der Kontrolle zum Zeitpunkt $t = 0$. Es konnten keine Proliferationsunterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen dargelegt werden ($p > 0,05$). Die Abbildung zeigt die Werte aus $n = 3$ Versuchsreihen. Aus Übersichtsgründen sind die Standardabweichungen der Mittelwerte nicht aufgezeigt. Der Mittelwert aller Standardabweichungen ergab für die Kontrolle 0,26, für P1D6 0,28 und für Fibronectin 0,24.

Bei Betrachtung der relativen Lumineszenzwertes beider Zelllinien fiel auf, dass die Zelllinie Caki-1 ein stärkeres Grundsignal generierte als die Zelllinie CCF-RC1. Über die Zeit gesehen blieb diese Differenz bestehen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Zellen der Zelllinie Caki-1 im Vergleich zu Zellen der Zelllinie CCF-RC1 einen erhöhten Zellstoffwechsel aufweisen, die Proliferationsraten beider Zelllinien aber ähnlich sind (Abb. 36).

4. Ergebnisse

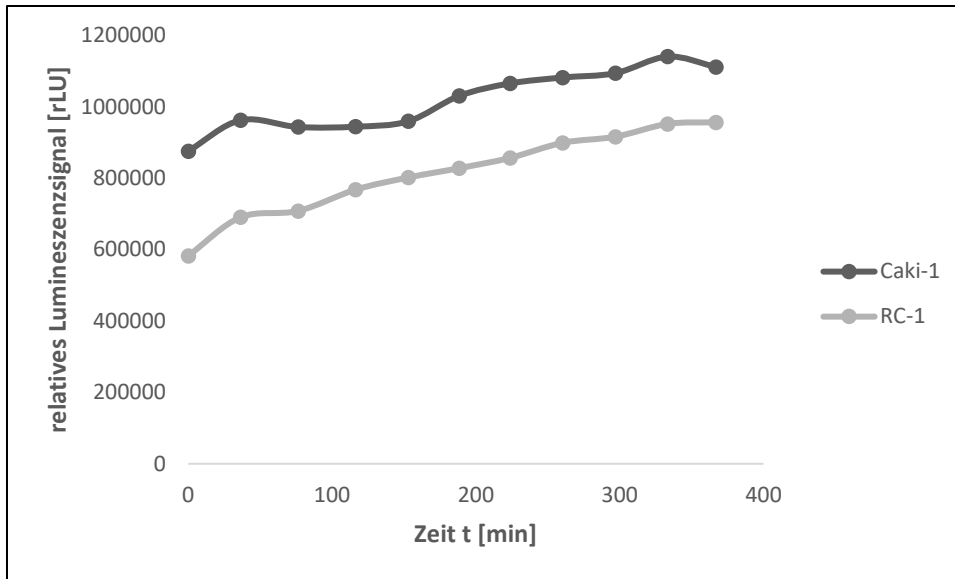


Abb. 36 Vergleich des relativen Lumineszenzsignals der Zelllinien Caki-1 und CCF-RC1 gegen die Zeit t[min]

Im Vergleich beider Zelllinien generierte die Zelllinie Caki-1 ein höheres relatives Lumineszenzsignal als die Zelllinie CCF-RC1. Diese Differenz blieb über die gesamte Zeit bestehen und lässt Rückschlüsse auf eine höhere Zellaktivität der Zelllinie Caki-1 zu.

In gleichem Ansatz wie der Proliferationsassay wurde parallel ein Zytotoxizitätsassay durchgeführt. Hierbei wurde der mögliche zytotoxische Effekt der Reagenzien, des Proliferations- und Zytotoxizitätsassays, der Antikörper und der Behandlungssubstanzen untersucht.

Die Verwendung oben genannter Substanzen hatte keinen Einfluss auf die Viabilität der Zelllinie Caki-1. Es konnte eine leichte Reduktion der relativen Anzahl zugrunde gegangener Zellen festgestellt werden. Während in der Kontrollgruppe eine Reduktion von 6% bemerkt wurde, blieb die relative Anzahl bei der mit Fibronectin behandelten Gruppe (97%) bzw. bei den mit P1D6 behandelten Zellen (100%) beinahe auf dem Ausgangsniveau (Abb. 37).

4. Ergebnisse

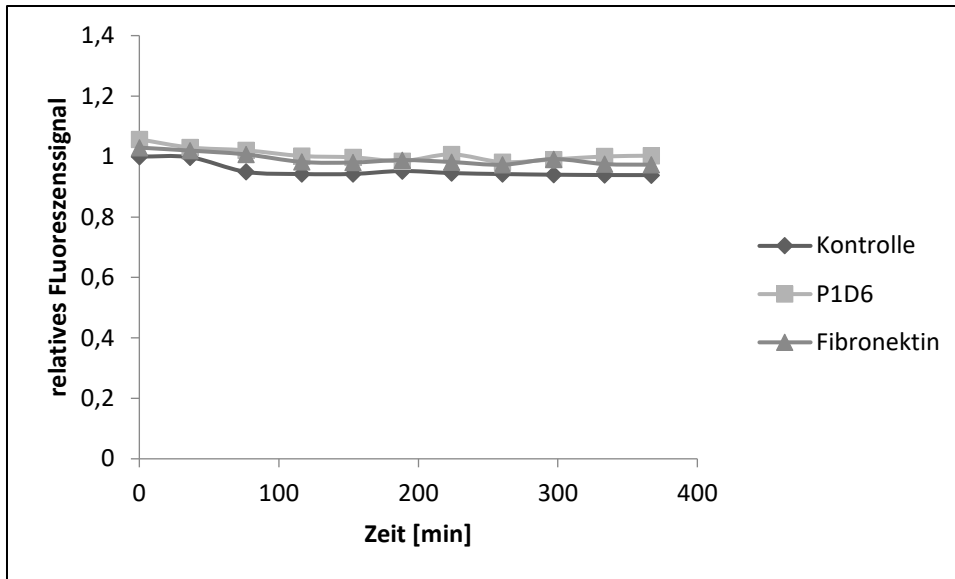


Abb. 37 Zytotoxizität der Zelllinie Caki-1 bei der Behandlung der Zellen mit Fibronectin bzw. Integrin- α 5-blockierendem Antikörper

Es konnte kein zytotoxischer Einfluss auf die Zelllinie Caki-1 dargelegt werden. Es wurden $n = 3$ Versuchsreihen in Dreifachansätzen durchgeführt. Auf die Standardabweichungen der Mittelwerte wird aus Übersichtsgründen verzichtet. Der Mittelwert aller Standardabweichungen ergab für die Kontrolle 0,02, für P1D6 0,07 und für Fibronectin 0,04.

Für die Zelllinie CCF-RC1 zeigte sich ein ähnliches Bild. Auch hier konnte keine Veränderung über die Zeit ausgehend vom Anfangsniveau festgestellt werden. Allein in den mit Fibronectin behandelten Zellen fiel eine erhöhte Zelltoxizität zu Beginn des Versuchs auf. Dieses erhöhte Ausgangsniveau glich sich im Verlauf den anderen beiden Kurven an. Ab dem Zeitpunkt $t = 116$ Minuten konnte auch hier keine weitere Veränderung der Zytotoxizität festgestellt werden. Im Vergleich zur Zelllinie Caki-1 konnte eine deutlichere Reduktion des relativen Fluoreszenzsignals beobachtet werden. So sank die Signalstärke von beginnend 100% auf 85% in der Kontrolle ab. Für die mit Fibronectin behandelten Zellen konnte eine Reduktion um 11%, für die mit P1D6 behandelten Zellen sogar von 15% beobachtet werden (Abb. 38).

4. Ergebnisse

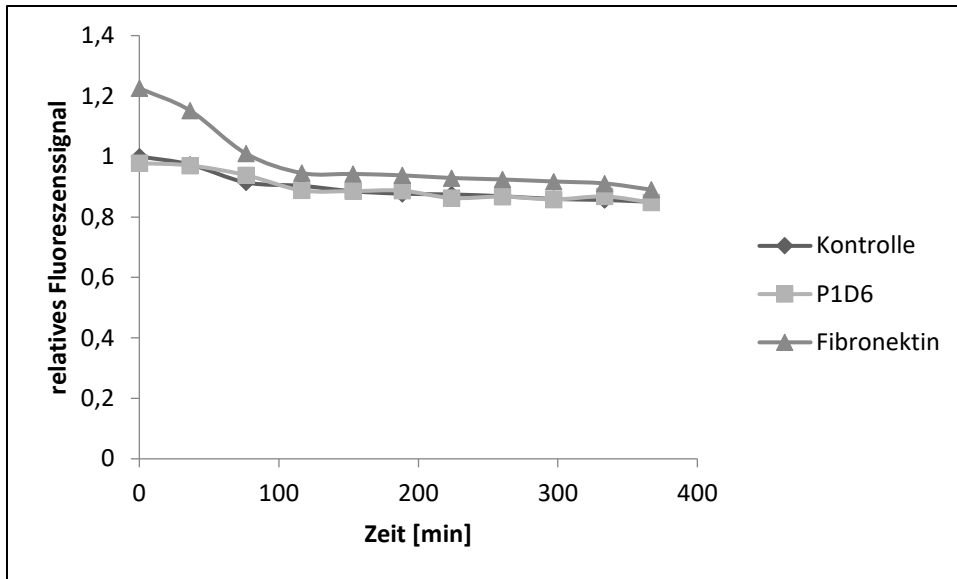


Abb. 38 Zytotoxizität der Zelllinie CCF-RC1 bei der Behandlung der Zellen mit Fibronectin bzw. Integrin- α 5-blockierendem Antikörper

Bei mit Fibronectin vorbehandelten Zellen war zunächst ein verstärkter zytotoxischer Effekt belegbar, welcher sich ab einer Zeit von $t = 116$ min an die beiden anderen Behandlungsgruppen angeglichen hat. Es wurden $n = 3$ Versuchsreihen in Dreifachansätzen durchgeführt. Auf die Standardabweichungen der Mittelwerte wird aus Übersichtsgründen verzichtet. Der Mittelwert aller Standardabweichungen ergab für die Kontrolle 0,08, für P1D6 0,07 und für Fibronectin 0,1.

Aus oben gewonnenen Daten lässt sich schlussfolgern, dass die Zugabe von Fibronectin einen zytotoxischen Effekt auf Nierenkarzinomzellen der Zelllinie CCF-RC1 aufweist. Dieser zytotoxische Effekt scheint allerdings keine zeitliche große Relevanz zu besitzen.

5. Diskussion

5.1 Integrin- α 5 β 1-Expression bei klarzelligen Nierenkarzinomzelllinien

Metastasierung ist ein komplexes Geschehen und beruht auf vielen einzelnen Prozessen. Integrine spielen bei diesen Prozessen eine entscheidende Rolle (176). Die Bedeutung von Integrin- α 5 β 1 für die Kanzerogenese und Metastasierung ist Gegenstand zahlreicher Publikationen. Bei einer Vielzahl von Tumoren konnte ein erhöhtes Expressionslevel von Integrin- α 5 β 1 mit Progression, Invasivität und Aggressivität des Tumors in Bezug gesetzt werden (143, 145-147). Für das Nierenzellkarzinom beschrieb Baehr F. eine signifikant erhöhte Integrin- α 5 β 1 Expression in tumorösen Gewebeproben verglichen zum entsprechenden Normalgewebe. Bezogen auf die histologischen Subtypen lagen statistisch signifikante Unterschiede vor ($p < 0,05$), wobei klarzellige Nierenzellkarzinome hierbei die höchste Integrinexpression aufwiesen (177). Aus diesem Grund wurden fünf Zelllinien (CCF-RC1, Caki-1, Caki-2, A-498, 786-O), die ccRCC repräsentieren (178), durch flowzytometrische Untersuchungen auf ihre Integrin- α 5 β 1-Expression hin untersucht. Hier bestätigte sich die Expression von Integrin- α 5 β 1 bei allen Zelllinien.

5.2 Beteiligung von Integrin- α 5 β 1 bei den metastatischen Prozessen Invasion, Intravasation und Extravasation

Um Metastasen bilden zu können müssen sich in einem ersten Schritt Zellen oder Zellverbände von dem Primärtumor lösen. Weiter entfernt gelegene Zielorgane können nur über die Blutbahn erreicht werden (179). Zum Erreichen der Blutgefäße invadieren die losgelösten Zellen zunächst das tumorumgebende Stroma (Invasion) und dringen anschließend in das Blutgefäß ein (Intravasation). Auch bei der Extravasation, dem Austreten aus dem Blutgefäß, und der Besiedelung der prämetastatischen Nische sind migratorische Prozesse der Tumorzelle unabdingbar (174). Hierbei spielen Zellprozesse beruhend auf der Adhäsionsfähigkeit und der Migrationsfähigkeit eine große Rolle und stehen in enger Beziehung zueinander. Diese Prozesse beruhen auf Integrinen als Moderatoren zwischen der Zelle und der extrazellulären Matrix. Die Extrazellulärmatrix besteht aus zwei großen Gruppen von Makromolekülen; auf der einen Seite die Proteoglykane, auf der anderen Seite die große Gruppe der fibrösen Proteine. Für die Interaktion der Zelle mit der Extrazellulärmatrix über Integrine sind

fibröse Proteine als Ligandenbindungspartner von entscheidender Bedeutung. Hierzu zählen unter anderem Laminin, Kollagen IV, Fibrinogen und Fibronectin (180).

Die Bedeutung von Integrin- $\alpha 5\beta 1$ in Bezug auf die Adhäsionsfähigkeit von Nierenkarzinomzellen wurde für diese vier Extrazellulärmatrixkomponenten getestet. Um einen Effekt aufzeigen zu können wurden unbehandelte Zellen mit Integrin- $\alpha 5\beta 1$ -spezifischem Antikörper behandelten Zellen verglichen. Nur für Fibronectin konnte eine relevante Reduktion des Adhäsionsverhaltens der Nierenkarzinomzellen gezeigt werden ($p < 0,05$). Eine analoge Rolle von Integrin- $\alpha 5\beta 1$ konnte bei Kolonkarzinomen (1) und malignen Melanomen (147) aufgezeigt werden. Frühe Ergebnisse, welche Integrin- $\alpha 5\beta 1$ als „Fibronectinrezeptor“ bezeichnen, konnten ebenfalls belegt werden (125, 134, 181). Bei Vorhandensein von Fibronectin kann häufig auch Fibrinogen als Bestandteil der extrazellulären Matrix gefunden werden (182). Als Bindungspartner für Fibroblast-growth factor (183) oder vascular endothelial growth factor (VEGF) (184) kommt Fibrinogen in der Tumorprogression eine tragende Rolle zu (185). Zwei RGD-Sequenzen auf der α -Kette (RGDS $\alpha 572-575$ und RGDF $\alpha 95-98$), sowie eine non-RGD-Sequenz auf der γ -Kette (C-Terminal $\gamma 400-411$) lassen eine Interaktion von Fibrinogen mit Integrinen vermuten (133, 173). Für Integrin- $\alpha 5\beta 1$ ist eine Interaktion mit endothelialen Zellen über die RGD-Sequenzen belegt (172). In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Adhäsionsfähigkeit von klarzelligen Nierenkarzinomzellen anhand einer Standardreihe ausgehend von 10 $\mu\text{g/ml}$ bis zu einer Konzentration von 2 mg/ml Fibrinogen untersucht und auf die Bindungsfähigkeit zu Fibronectin bezogen. Sowohl für Caki-1 als auch CCF-RC1 konnte eine Bindung an Fibrinogen belegt werden, wobei nur CCF-RC1 ab einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ eine ähnliche Bindungsstärke wie zu Fibronectin 10 $\mu\text{g/ml}$ aufzeigte. Caki-1-Zellen erreichten eine relative Bindungsstärke von maximal 65% bei einer Fibrinogenkonzentration von 1 mg/ml . Um die Adhäsion der Zellen an Fibrinogen auf Integrin- $\alpha 5\beta 1$ zurückzuführen, wurden die Zellen zunächst mit einem Integrin- $\alpha 5\beta 1$ -Antikörper inkubiert. Bei erneuter Visualisierung der Zelladhäsion mittels Kristallviolett zeigte sich keine signifikante Reduktion der Zelladhäsion. Dies lässt darauf schließen, dass die zuvor detektierte Adhäsion über andere Moleküle, wie z.B. den CD44-Rezeptor stattgefunden haben könnte (173). Wissenschaftliche Erkenntnisse zweifeln jedoch Herricks *et al.* Behauptung an. Laut Ponta *et al.* ist eine Bindung über CD44 nur für Interaktionen mit Hyaluronsäure belegt (186). Auf Grundlage dieser Arbeit zeigt

sich, dass Adhäsionsprozesse durch Integrin- α 5 im Rahmen metastatischer Prozesse bei NZK-Zellen nur auf Fibronectin zurückzuführen sind.

Migration stellt für metastasierende Zellen eine essenzielle Grundvoraussetzung dar. Nur durch migratorische Fähigkeiten ist es Zellen möglich den Ort des Primärtumors zu verlassen, durch endotheliale Strukturen in das Gefäßsystem einzudringen und dieses auch wieder zu verlassen, sowie am Ort der Metastase erfolgreich die präformierte Nische zu erreichen und zu besiedeln (76). Wissenschaftliche Erkenntnisse konnten einen Zusammenhang zwischen Integrin- α 5 β 1, der Bildung von Fibronectinfibrillen und der Interaktion dieser Fibrillen mit Aktinfilamenten als Zellmotor aufdecken (187). Integrin- α 5 β 1 wird hierbei aus fokalen Adhäsionen recycelt, wandert in einem rolltreppenartigen Verfahren über Aktinfilamente zu gelösten Extrazellulärmatrixkomponenten und bindet diese. Hierdurch kommt es zu einer Aktivierung der Integrin-Zytoskelettverbindung, dem Aufbau von Stressfasern, fokalen Adhäsionen und zellulärer Beweglichkeit in einem dynamischen Prozessgeschehen (187, 188). Nach Burridge *et al.* kommt es durch intrinsische Aktivierung von RhoA (*Ras homolog family member A*) zur Ausbildung von Stressfasern und Integrinclustering an der Zelloberfläche, welches eine stärkere Bindung an extrazelluläre Matrixbestandteile ermöglicht. Diese aktivierten Integrine führen über Aktivierung der RAC/ROCK Signalkaskade durch P¹³⁰CAS zur Hemmung der Stressfaserbildung und Ausbildung von Lamellopodien (189, 190).. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei Blockade der Integrinrezeptoren mittels P1D6-Antikörper eine signifikante Reduktion der migrierten Zellzahl. Nach Pankov *et al.* können bei Unterbrechung des Wanderungszyklus von Integrin- α 5 β 1 keine Extrazellulärmatrix-Zell-Verbindungen und Bildungen von Fibronectinfibrillen als Ausgangspunkt fokaler Adhäsionspunkte gebildet werden (187). Darüber hinaus sind verminderte Migrationsraten bei Inhibition des Integrins α 5 β 1 auch für Kolon-, Lungen- und Ovarialkarzinome belegt (1, 158, 191). Analog der Adhäsionsversuche wurde auch Fibrinogen wegen des Vorhandenseins seiner RGD-Sequenzen auf seine chemotaktischen Eigenschaften für das Integrin- α 5 hin untersucht (133, 173). Bezogen auf Fibronectin als Positivkontrolle migrierten weniger als 10% der Zellen. Auch bei Verwendung verschiedener Fibrinogenkonzentrationen von 20-200 μ g/ml konnte kein Unterschied festgestellt werden. Dies belegt, dass Fibrinogen nicht als Chemotaxin für klarzellige Nierenkarzinomzellen angesehen werden kann.

Fibronectin als ein Bestandteil der Extrazellulärmatrrix bestimmt über die Adhäsion und Migration das Metastasierungsverhalten von Nierenzellkarzinomen. Zum einen in den anfänglichen Prozessen der Invasion des umgebenden Tumorstromas und zum anderen in den Intravasationsprozessen kommt Integrin- $\alpha 5\beta 1$ als Hauptbindungspartner von Fibronectin eine entscheidende Rolle zu. Kaplan *et al.* beschreiben für das Lewis- Lungenkarzinom, sowie bei den malignen Melanomzellen-B16 eine erhöhte Fibronectinexpression in der prämetastatischen Nische. Fibronectin wird in den Sekundär-Organen durch ortsansässige, fibroblasten-ähnliche Stromazellen gebildet und platziert (112). Gehen wir davon aus, dass die prämetastatische Nische reich an Fibronectin ist, könnten zirkulierende Nierenkarzinomzellen an diesen Orten Integrin- $\alpha 5\beta 1$ -vermittelt entlang des Konzentrationsgefälles von Fibronectin in die Nische migrieren, um dort Mikro- oder Makrometastasen zu bilden. Allerdings wären zunächst weitere Studien zur Untersuchung der prämetastatischen Nische und deren Zusammensetzung in Bezug auf das Nierenzellkarzinoms nötig.

5.3 Adhäsion und Migration beruhen auf der Beteiligung der AKT- und ERK-Signalkaskaden

Durch Adhäsion an Extrazellulärmatrrixkomponenten durch Integrin- $\alpha 5\beta 1$ kommt es in der Tumorzelle durch Outside-In Signaling zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden. Durch Rekrutierung des FAK/SRC Komplexes kommt es zur Aktivierung des ERK-Signalweges über GRB und RAC (Abb. 7) (136). Durch Aktivierung eines weit verzweigten Downstreamnetzwerks werden Zellproliferations-, Zelldifferenzierungs- und Überlebensprozesse der Zelle stimuliert. PI3K/AKT-Signalkaskaden können ebenso über FAK/SRC-Komplexe durch Integrine aktiviert werden, wie durch die Rekrutierung von ILK's an das transmembranäre Protein (136). Dieses Netzwerk kann über Aktivierung von CDK2 (*Cyclin dependent kinase 2*) die Zellproliferation modulieren. Über die Einflüsse auf XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) und BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*) kann das Zellüberleben durch Steuerung der Apoptose reguliert werden (192). Die Steuerung der Zellmobilität geschieht durch Rekrutierung des FAK/SRC-Komplexes an das Integrin und nachgeschalteter Aktivierung des p^{130} CAS/DOCK/RAC-Signalnetzwerks (136). Bei den hier durchgeführten Westernblotuntersuchungen ergaben sich Hinweise auf eine Beteiligung des PI3K/AKT-Signalweges bei der Zelllinie Caki-1. Bei der Zelllinie CCF-RC1 hingegen spielt offenbar das ERK 1/2-Signalnetzwerk eine Rolle (Tab. 9).

Tab. 9: Expression bzw. Aktivität der untersuchten Proteine

	Caki-1		CCF-RC1	
	Fibronectin	P1D6	Fibronectin	P1D6
Paxillin/pPaxillin	0/ +	+ /++	+ /0	+ /0
FAK/pFAK	- /-	0 /0	+ /+	0 /0
SRC/pSRC	0 /+	0 /0	+ /0	0 /-
SHC/pSHC	0 /0	0 /0	0 /0	0 /0
AKT/pAKT	0 /+++	0 /-	0 /+0	0 /+
ERK/pERK	0 /++	0 /++	0 /0	- /--

Bei der Analyse von 141 Gewebeproben von Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinomen beschrieb Baehr F. eine Korrelation zwischen der Integrin- $\alpha 5\beta 1$ -Expression und dem Aktivitätslevels des FAK/SHC/ERK- Signalnetzwerkes (177). So bildet die Zelllinie CCF-RC1 das *in vivo*-Geschehen besser ab als die Zelllinie Caki-1. Durch Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten bereits die $\beta 1$ -FAK-Achse und $\beta 1$ -AKT-Achse als Rückgrat migratorischer Prozesse der Nierenkarzinomzellen ausgemacht werden (149, 193). Eine Beteiligung von FAK und SHC an migratorischen Prozessen konnte durch diese Arbeit nicht aufgezeigt werden. Die Beteiligung des AKT-Signalnetzwerkes wurde durch diese Arbeit anhand der Zelllinie Caki-1 bestätigt. In Kapitel 1.3.2 wird beschrieben, dass die Modulation der Signalproteine FAK/SRC/ERK/AKT von der β -Untereinheit des Integrins ausgehen. Vorliegende Ergebnisse zeigen jedoch bei Verwendung eines Integrin- $\alpha 5$ -spezifischen Antikörpers auch eine Beteiligung der α -Untereinheit an oben genannten zellulären Signalprozessen. Nach Tanimura *et al.* reguliert das ERK 1/2-Signalnetzwerk über die Kinasen WAVE2 (*Wiskott Aldrich Syndrom Protein 2*), ABI 1 (*Abl interactor 1/Abelson interactor 1*) und RSK (*Ribosomal protein S6 kinase*) migratorische Abläufe von Zellen. Über die Modulation der GEF-H1 (*Guanine exchange factor H1*) und p27^{Kib1}-Proteine (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*) werden Zellretraktionsabläufe durch ERK 1/2

gesteuert (194). Darüber hinaus wurden auch zell-differenzierende und Apoptose modulierende Effekte für ERK 1/2 beschrieben (195). Obwohl das AKT-Signalnetzwerk hauptsächlich für seine apoptosemodulierenden, proliferativen und zell-differenzierenden Effekte bekannt ist, beschrieben Weng *et al.* eine positive Stimulation für migratorische Prozesse über die Aktivierung von Girdin (196, 197). Dieses spielt für die Reorganisation des Aktin-Skeletts der Zellen eine entscheidende Rolle (198). Bei endothelialen Ovarialkarzinomen konnte ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression von Integrin- $\alpha 5\beta 1$ und der Phosphorylierung von Paxillin und FAK beschrieben werden (199). In dieser Arbeit konnten weder für Paxillin, noch FAK Effekte beschrieben werden. Tanaka *et. al* beschrieben eine direkte Interaktion von Paxillin an der zytoplasmatischen β -Untereinheit des Integrins (200). Diese wird jedoch durch die Verwendung von P1D6-Antikörpern nicht beeinflusst. Turner *et al* beschrieben eine Interaktion von Paxillin mit fokaler Adhäsionskinase (FAK) (201), welche jedoch bei der Untersuchung der Zelllinien CCF-RC1 und Caki-1 nicht verändert dargestellt werden konnte. Im Widerspruch dazu steht die Aussage zahlreicher Arbeitsgruppen, nach welcher Paxillin ein spezifisches Adapterprotein nur für Integrin- $\alpha 4$ darstellt (128, 202, 203).

Bei anderen Tumorentitäten konnte eine Beteiligung des AKT- und ERK 1/2- Systems ebenfalls in Bezug zu Migrations- und Adhäsionsprozessen gesetzt werden. Adhäsionsverluste von Kolonkarzinomzellen waren auf eine Reduktion der Aktivität des AKT- und ERK 1/2-Signalsystems zurückzuführen (1, 151).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ERK 1/2 und AKT Einfluss auf Migrations- und Adhäsionsprozesse der Nierenkarzinomzellen nehmen. Zur Evaluierung der damit involvierten Signalmoleküle sind weitere Studien erforderlich. Aufschluss könnte die Untersuchung von ILK's als Integrin-Adapterprotein als Ausgangspunkt geben. Zur Downstreamuntersuchung stellen die Proteine Girdin, WAVE2, RSK, GEF-H1 und p27^{Kib1} interessante Ansatzpunkte dar.

5.4 Beteiligung von ERK 1/2 und AKT auf das Zellüberleben und die Proliferation von Nierenkarzinomzellen

Wie bereits oben beschrieben, nehmen die Kinasen AKT und ERK 1/2 eine Schlüsselrolle in vielen vitalen Zellprozessen ein. Neben Einfluss auf Migrations- und Adhäsionsprozesse kommt beiden Kinasen eine Schlüsselrolle in proliferativen Prozessen und dem Zellüberleben zu (175, 204-206). Zellüberleben ist ein balancierter

Prozess aus Zellproliferation, Apoptose, Nekrose und Autophagie. In diesem Sinne kommt dem PI3K/AKT-Netzwerk eine Schlüsselstellung zu. Nach Aktivierung von PI3K durch Rezeptortyrosinkinasen wird der Second Messenger PIP₃ (*Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate*) gebildet. Dieser aktiviert die Kinase AKT im Zytoplasma (205). Im Downstreamnetzwerk von AKT spielt die Phosphorylierung von drei Enzymen eine entscheidende Rolle, um das Zellgleichgewicht zugunsten der Apoptose zu verschieben. Durch Phosphorylierung von Bcl-2 kann der Bcl-2/Bcl-X_L- (*B-cell lymphoma-extra large*) Komplex nicht gebildet werden. Die antiapoptotische Wirkung von Bcl-X_L kommt dadurch nicht zum Tragen (207). Als zweites Enzym wird Caspase 9 durch AKT phosphoryliert und hierdurch inaktiviert. Der pro-apoptotische Effekt der Caspase kommt dadurch zum Erliegen (208). Durch die Phosphorylierung von FKHR (*Forkhead in rhabdomyosarcoma*) inhibiert AKT die Transkription der Gene BIM (*Bcl-2-like protein 11*) und FAS-ligand (*TNF superfamily receptor 6*), welche pro-apoptotische Funktion besitzen (206).

Für die Phosphokinase ERK sind mittlerweile mehr als 150 Substrate bekannt (209). Bei der Beteiligung an Zelladhäsionsprozessen wird die Kinase an die Zellmembran rekrutiert und wirkt dort auf ihre Downstream-Komponenten (204, 210). Über die Regulation von c-myc (*Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog*) und c-jun (*cellular jun*) nimmt die Phosphokinase Einfluss auf apoptotische und proliferative Zellprozesse (209). Zum anderen beschrieben Dent *et al.* eine Interaktion zwischen AKT und ERK 1/2, in deren Verlauf die anti-apoptotischen Prozesse von AKT aktiviert werden (175).

Proliferation und Zellwachstum werden durch AKT und ERK 1/2 ebenfalls entscheidend beeinflusst. So kommt es durch Inhibition von GSK3 β (*Glycogen synthase kinase 3 β*) durch AKT zur Akkumulation von Cyklin D1 im Zellkern und zur Initiierung des Zellzyklus (211). Der pro-proliferative Effekt wird durch Inhibition des Protein p27^{Kib1}, eines CKI's (*Cyklin dependent kinase inhibitor*), verstärkt. Durch Transportmechanismen kann die Kinase ERK 1/2 in den Zellkern transportiert werden. Dort werden durch Interaktion mit vielen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. CPS II (*Carbamoylphosphate synthetase II*) (für die DNA-Synthese), p90 RSK (*90kD Ribosomale Protein S6 Kinase*) (für Zell-Zyklus-Progression) und vieler anderer proliferative Prozesse angestoßen (212, 213): Eferl *et al.* beschreiben einen Signalweg zur Regulation von c-fos (*cellular Fos*) über ERK 1/2 und Elk-1 (*ETS transcription factor ELK1*) als proliferativen Zellprozess (214). Auch im Zusammenhang mit proliferativen

Prozessen gehen AKT und ERK 1/2 Hand in Hand. Einerseits kommt es zu Interaktionen beider Signalkaskaden, andererseits kann ERK 1/2 direkt die GSK3 β aktivieren und hierdurch das Zell-Zyklus-Programm initiieren (210).

Beide Kinasen sind in Krebszellen hochreguliert (215, 216). Durch Mutationen einzelner Proteine innerhalb des Netzwerkes könnten Effekte durch Inhibition des Integrin- α 5 ausgelöscht werden. Zum anderen beschrieben Li *et al.* die Regulation der Viabilitätsprozesse durch die β -Untereinheit des Integrins, welche durch die Verwendung des P1D6-Antikörpers nicht beeinflusst wird (217). Die *in vitro*-Untersuchungen zeigen keinen Einfluss von Integrin- α 5 β 1 auf das Zellüberleben. Hervorzuheben ist hierbei auch kein nachweisbarer Effekt durch die Bindung von Fibronektin an andere Rezeptoren, wie Integrin- α 4 β 1, welches im Gegensatz zu Normalgewebe nur bei verändertem Nierengewebe nachweisbar ist (218). Lee *et al.* beschrieben bei gebundenem Integrin- α 5 β 1 an Fibronektin eine drastische Aktivierung des PKB/AKT-Signalweges durch Wachstumsfaktoren bei intestinalen epithelialen Zellen (219). In dieser Arbeit konnte der nicht vorhandene Proliferationseffekt durch das Fehlen von Wachstumsfaktoren in serumfreiem Medium, welches für die Experimente genutzt wurde, erklärbar sein. Zhou *et al.* beschrieben einen engen Zusammenhang zwischen Integrin- α 5 und AKT bei Blasenkarzinomen über NEU1. Durch erhöhte Konzentrationen von NEU1 wurde die Interaktion zwischen Integrin- α 5 und Fibronektin unterbrochen. Nachfolgend zeigte sich eine Inhibition des AKT-Signalweges bei Blasenkarzinomzellen (220).

Vorliegende Ergebnisse zeigen, dass Integrin- α 5 β 1 für das Erreichen der prämetastatischen Nische unabdingbar ist. Adhäsionsprozesse und Migrationsprozesse durch Integrin- α 5 über die Extrazellulärmatrixkomponente Fibronektin konnten in dieser Arbeit klar aufgezeigt werden. Die Signalmoleküle ERK 1/2 und AKT liegen diesen Prozessen zugrunde. Die in der Literatur beschriebenen Einflüsse beider Signalmoleküle auf Zellüberleben und Zellproliferation konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Hierbei scheinen andere Faktoren, allen voran Wachstumsfaktoren eine bedeutendere Rolle zu spielen.

5.5 Volociximab als neue Therapiestrategie des Nierenzellkarzinoms

Ohne Integrine ist eine Zelladhäsion und -migration sehr unwahrscheinlich. Für Integrin- α 5 konnte eine Beteiligung an diesen Prozessen durch seinen Liganden Fibronektin aufgezeigt werden. In klinischen Studien wird bereits die Substanz

Volociximab, ein chimerischer Integrin- $\alpha 5\beta 1$ - Antikörper bei fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen und Peritonealkarzinosen erforscht (221, 222). Volociximab zeigte im Tiermodell vielversprechende anti-angiogene Ergebnisse (222). Eine gute Verträglichkeit bei Anwendung an Patienten konnte in Phase I und Phase II Studien belegt werden, auch bei Nierenzellkarzinompatienten (221, 223-225). Bei Chemotherapie resistenten Ovarialkarzinomen, sowie malignen Melanomen und NSCLC konnte bei Verwendung von Volociximab eine Reduktion von CEPCs (*circulating endothelial progenitor cell*) gezeigt werden (226-229). Diese spielen wichtige Rolle bei Tumorwachstum und -angiogenese und können als negative Prognosemarker bei Tumorerkrankungen herangezogen werden (230, 231). Auch bei Nierenzellkarzinomen können CEPCs als Biomarker für eine Progression des Tumors herangezogen werden (232). In weiteren Studien sollte der Effekt von Volociximab auf die CEPCs bei Nierenzellkarzinomen untersucht werden. Hierdurch könnten bessere Vermutungen bezüglich des Erfolges von Volociximab in Phase III Studien getroffen werden. Als weiteres Einsatzgebiet wäre die Verwendung von Volociximab nach operativen Verfahren zur Tumorreduktion bei fortgeschrittenem Tumorleiden zum Erreichen einer stable-disease vorstellbar.

6. Zusammenfassung

Metastasierte Tumoren sind mit einem Anteil von > 90% für den größten Teil der tumorassoziierten Sterblichkeit verantwortlich. Durch lokale Invasion, Intravasation, Zirkulation, Extravasation und Kolonisierung wird es einzelnen Tumorzellen oder kleinen Tumorzellverbänden nach Adhäsionsverlust an den Primärtumor ermöglicht, Metastasen zu bilden. Für das Nierenzellkarzinom sind neben lymphogener Metastasierung in die paraaortalen und parakavalen Lymphknoten die Lunge, Leber, das Skelettsystem und das zentrale Nervensystem als primäre hämatogene Metastasierungslokalitäten. Die Erforschung neuer therapeutischer Ansätze in der Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms ist von tragender Bedeutung. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte Integrin- $\alpha 5\beta 1$ als Prognosemarker für klarzellige Nierenzellkarzinome identifiziert werden.

Die Bedeutung von Integrin- $\alpha 5$ bei metastasierten Nierenzellkarzinomen wurde in dieser Arbeit durch *in vitro*-Untersuchungen an den Zelllinien CCF-RC1 und Caki-1 unter Verwendung eines Integrin- $\alpha 5$ -spezifischen Antikörpers untersucht. Fibronektin wurde als einziger Ligand für Integrin- $\alpha 5\beta 1$ in Adhäsionsversuchen bestätigt. Durch die Verwendung des Antikörpers konnte darüber hinaus eine signifikante Reduktion des Adhäsionsverhaltens aufgezeigt werden. Um mögliche Chemotaxine für Nierenkarzinomzellen zu ermitteln wurde eine modifizierte Boydenkammer verwendet. Als einziges Chemotaxin konnte hierbei Fibronektin ermittelt werden. Durch Integrin- $\alpha 5$ -Blockade migrierten signifikant weniger Zellen in Richtung des Chemotaxins. Expressions- und Aktivitätsuntersuchungen von prominenten Signalmolekülen ergaben eine Beteiligung des PI3K/AKT-Signalsystems in der Zelllinie Caki-1. In der Zelllinie CCF-RC1 hingegen ließen sich für das MAPK-System über die Untersuchung von ERK 1/2 Effekte zeigen. Beide Signalkaskaden nehmen Einfluss auf zelluläre Prozesse wie Apoptose und Zellproliferation. Ein Einfluss von Integrin- $\alpha 5\beta 1$ bzw. der aktivierten Signalkaskaden durch Fibronektin konnte im Zellvitalitätstest nicht gezeigt werden.

Durch diese Arbeit konnte eine Beteiligung von Integrin- $\alpha 5\beta 1$ für die Prozesse der Invasion, Intravasation und Extravasation belegt werden. Durch die gezeigte Reduktion dieser zellulären Abläufe könnte eine weitere Ausbreitung und Metastasierung *in vivo* verhindert werden. Die tumorassoziierte Sterblichkeit für Nierenzellkarzinome würde sinken. Die weitere Proliferation der prämetastatischen

Nische besiedelnden Zellen ist von anderen Rezeptoren und zellulären Abläufen abhängig. Volociximab befindet sich als Integrin- $\alpha 5\beta 1$ -Inhibitor bereits in der klinischen Erforschung. Es zeigte sich eine gute Verträglichkeit des Wirkstoffs bei den Studienteilnehmern. Aufgrund der hier vorliegenden Ergebnisse sollte die klinische Erprobung bei metastasierten Nierenzellkarzinompatienten in Phase III Studien, sowie bei fortgeschrittenem Tumorleiden zum Erreichen einer stable-disease erwogen werden.

7. Literaturverzeichnis

1. Murillo CA, Rychahou PG, Evers BM. Inhibition of alpha5 integrin decreases PI3K activation and cell adhesion of human colon cancers. *Surgery*. 2004;136(2):143-9.
2. Mitra AK, Sawada K, Tiwari P, Mui K, Gwin K, Lengyel E. Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and alpha(5)beta(1)-integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis. *Oncogene*. 2011;30(13):1566-76.
3. Morozevich G, Kozlova N, Cheglakov I, Ushakova N, Berman A. Integrin alpha5beta1 controls invasion of human breast carcinoma cells by direct and indirect modulation of MMP-2 collagenase activity. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2009;8(14):2219-25.
4. Nam JM, Onodera Y, Bissell MJ, Park CC. Breast cancer cells in three-dimensional culture display an enhanced radioresponse after coordinate targeting of integrin alpha5beta1 and fibronectin. *Cancer research*. 2010;70(13):5238-48.
5. Ljungberg B, Campbell SC, Choi HY, Jacqmin D, Lee JE, Weikert S, et al. The epidemiology of renal cell carcinoma. *European urology*. 2011;60(4):615-21.
6. Institut ZfKuR-K. Krebs in Deutschland für 2017/2018. 2018.
7. Chow WH, Dong LM, Devesa SS. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nature reviews Urology*. 2010;7(5):245-57.
8. Lee JE, Mannisto S, Spiegelman D, Hunter DJ, Bernstein L, van den Brandt PA, et al. Intakes of fruit, vegetables, and carotenoids and renal cell cancer risk: a pooled analysis of 13 prospective studies. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2009;18(6):1730-9.
9. Lee JE, Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO, Albanes D, Bernstein L, et al. Alcohol intake and renal cell cancer in a pooled analysis of 12 prospective studies. *Journal of the National Cancer Institute*. 2007;99(10):801-10.
10. Topiwala A, Allan CL, Valkanova V, Zsoldos E, Filippini N, Sexton C, et al. Moderate alcohol consumption as risk factor for adverse brain outcomes and cognitive decline: longitudinal cohort study. *BMJ (Clinical research ed)*. 2017;357:j2353.
11. Petejova N, Martinek A. Renal cell carcinoma: Review of etiology, pathophysiology and risk factors. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*. 2016;160(2):183-94.
12. Buhagen M, Gronskag A, Ragde SF, Hilt B. Association Between Kidney Cancer and Occupational Exposure to Trichloroethylene. *Journal of occupational and environmental medicine*. 2016;58(9):957-9.

13. Karami S, Boffetta P, Stewart PS, Brennan P, Zaridze D, Matveev V, et al. Occupational exposure to dusts and risk of renal cell carcinoma. *British journal of cancer*. 2011;104(11):1797-803.
14. Aulitzky WE, Beck J, Huber C. Nierenzellkarzinom. In: Hiddemann W, Bartram CR, editors. *Die Onkologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010. p. 1087-103.
15. Pfaffenroth EC, Linehan WM. Genetic basis for kidney cancer: opportunity for disease-specific approaches to therapy. *Expert opinion on biological therapy*. 2008;8(6):779-90.
16. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *European urology*. 2016;70(1):93-105.
17. Srigley JR, Delahunt B, Eble JN, Egevad L, Epstein JI, Grignon D, et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia. *The American journal of surgical pathology*. 2013;37(10):1469-89.
18. Inamura K. Renal Cell Tumors: Understanding Their Molecular Pathological Epidemiology and the 2016 WHO Classification. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(10).
19. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature*. 2013;499(7456):43-9.
20. Davis CF, Ricketts CJ, Wang M, Yang L, Cherniack AD, Shen H, et al. The somatic genomic landscape of chromophobe renal cell carcinoma. *Cancer cell*. 2014;26(3):319-30.
21. Zigeuner R, Golbeck SV, Pichler M. Nierenparenchymentumoren. In: Michel MS, Thüroff JW, Janetschek G, Wirth M, editors. *Die Urologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. p. 327-46.
22. B. Ljungberg (Chair) LA, K. Bensalah, A. Bex (Vice-chair), R.H. Giles (Patient Advocate), M. Hora, M.A. Kuczyk, T. Lam, L. Marconi, A.S. Merseburger, T. Powles, M. Staehler, A. Volpe EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Copenhagen 2018, Renal Cell Carcinoma: EAU Guidelines Office, Arnhem, The Netherlands.
<http://uroweb.org/guidelines/compilations-of-all-guidelines/> 2018 [updated 2018. Available from: <http://uroweb.org/guideline/renal-cell-carcinoma/#5>.
23. Fornara P, Hoda MR. Das Nierenzellkarzinom. *Der Urologe*. 2011;50(1):219.
24. Bedke J, Buse S, Kurosch M, Haferkamp A, Jäger D, Hohenfellner M. Paraneoplastische Syndrome des Nierenzellkarzinoms. *Der Urologe*. 2007;46(1):45-8.
25. Kim HL, Belldegrun AS, Freitas DG, Bui MH, Han KR, Dorey FJ, et al. Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: implications for prognosis. *The Journal of urology*. 2003;170(5):1742-6.

26. Sacco E, Pinto F, Sasso F, Racioppi M, Gulino G, Volpe A, et al. Paraneoplastic syndromes in patients with urological malignancies. *Urologia internationalis*. 2009;83(1):1-11.
27. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. S3-Leitlinie Diagnostik TuNdNLAA-RO, zitiert am 21.01.2021. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms Langversion: Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften; 2020 [updated 14.09.2020; cited 2021 21.01.]. Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/043-017OL-I_S3_Diagnostik-Therapie-Nachsorge-Nierenzellkarzinom_2020-09_1.pdf.
28. Escudier B, Porta C, Schmidinger M, Rioux-Leclercq N, Bex A, Khoo V, et al. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2016;27(suppl 5):v58-v68.
29. Lane BR, Samplaski MK, Herts BR, Zhou M, Novick AC, Campbell SC. Renal mass biopsy--a renaissance? *The Journal of urology*. 2008;179(1):20-7.
30. Marconi L, Dabestani S, Lam TB, Hofmann F, Stewart F, Norrie J, et al. Systematic Review and Meta-analysis of Diagnostic Accuracy of Percutaneous Renal Tumour Biopsy. *European urology*. 2016;69(4):660-73.
31. Phe V, Yates DR, Renard-Penna R, Cussenot O, Roupret M. Is there a contemporary role for percutaneous needle biopsy in the era of small renal masses? *BJU international*. 2012;109(6):867-72.
32. Volpe A, Kachura JR, Geddie WR, Evans AJ, Gharajeh A, Saravanan A, et al. Techniques, safety and accuracy of sampling of renal tumors by fine needle aspiration and core biopsy. *The Journal of urology*. 2007;178(2):379-86.
33. Amin MB, Edge SB. *AJCC cancer staging manual*: springer; 2017.
34. Swami U, Nussenzevig RH, Haaland B, Agarwal N. Revisiting AJCC TNM staging for renal cell carcinoma: quest for improvement. *Annals of translational medicine*. 2019;7(Suppl 1):S18.
35. Brenner W, Haber T, Junker K, Roos F, Thuroff JW. [Bone metastasis by renal cell carcinoma. Importance of calcium and calcium-sensing receptor]. *Der Urologe Ausg A*. 2015;54(6):839-43.
36. Erlmeier F, Weichert W, Autenrieth M, Wiedemann M, Schrader AJ, Hartmann A, et al. PD-L2: A prognostic marker in chromophobe renal cell carcinoma? *Medical oncology (Northwood, London, England)*. 2017;34(5):71.

37. Farber NJ, Kim CJ, Modi PK, Hon JD, Sadimin ET, Singer EA. Renal cell carcinoma: the search for a reliable biomarker. *Translational cancer research*. 2017;6(3):620-32.
38. Frees S, Breuksch I, Haber T, Bauer HK, Chavez-Munoz C, Raven P, et al. Calcium-sensing receptor (CaSR) promotes development of bone metastasis in renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2018;9(21):15766-79.
39. Kinouchi T, Uemura M, Wang C, Ishizuya Y, Yamamoto Y, Hayashi T, et al. Expression level of CXCL7 in peripheral blood cells is a potential biomarker for the diagnosis of renal cell carcinoma. *Cancer science*. 2017;108(12):2495-502.
40. Pastore AL, Palleschi G, Silvestri L, Moschese D, Ricci S, Petrozza V, et al. Serum and urine biomarkers for human renal cell carcinoma. *Disease markers*. 2015;2015:251403.
41. Silva DD, Noronha JAP, Pinheiro da Costa BE, Zandona PCE, Carvalhal GF. Serum tissue factor as a biomarker for renal clear cell carcinoma. *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology*. 2018;44(1):38-44.
42. Tanaka T, Kitamura H, Torigoe T, Hirohashi Y, Sato E, Masumori N, et al. Autoantibody against hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase-3 is a potential serological marker for renal cell carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2011;137(5):789-94.
43. Aboumarzouk OM, Stein RJ, Eyraud R, Haber GP, Chlosta PL, Somani BK, et al. Robotic versus laparoscopic partial nephrectomy: a systematic review and meta-analysis. *European urology*. 2012;62(6):1023-33.
44. Froghi S, Ahmed K, Khan MS, Dasgupta P, Challacombe B. Evaluation of robotic and laparoscopic partial nephrectomy for small renal tumours (T1a). *BJU international*. 2013;112(4):E322-33.
45. Gill IS, Kavoussi LR, Lane BR, Blute ML, Babineau D, Colombo JR, Jr., et al. Comparison of 1,800 laparoscopic and open partial nephrectomies for single renal tumors. *The Journal of urology*. 2007;178(1):41-6.
46. Lane BR, Gill IS. 7-year oncological outcomes after laparoscopic and open partial nephrectomy. *The Journal of urology*. 2010;183(2):473-9.
47. Marszalek M, Meixl H, Polajnar M, Rauchenwald M, Jeschke K, Madersbacher S. Laparoscopic and open partial nephrectomy: a matched-pair comparison of 200 patients. *European urology*. 2009;55(5):1171-8.
48. Merseburger AS, Herrmann TR, Shariat SF, Kyriazis I, Nagele U, Traxer O, et al. EAU guidelines on robotic and single-site surgery in urology. *European urology*. 2013;64(2):277-91.

49. MacLennan S, Imamura M, Lapitan MC, Omar MI, Lam TB, Hilvano-Cabungcal AM, et al. Systematic review of oncological outcomes following surgical management of localised renal cancer. *European urology*. 2012;61(5):972-93.
50. MacLennan S, Imamura M, Lapitan MC, Omar MI, Lam TB, Hilvano-Cabungcal AM, et al. Systematic review of perioperative and quality-of-life outcomes following surgical management of localised renal cancer. *European urology*. 2012;62(6):1097-117.
51. Buti S, Bersanelli M, Sikokis A, Maines F, Facchinetti F, Bria E, et al. Chemotherapy in metastatic renal cell carcinoma today? A systematic review. *Anti-cancer drugs*. 2013;24(6):535-54.
52. Heng DY, Xie W, Regan MM, Harshman LC, Bjarnason GA, Vaishampayan UN, et al. External validation and comparison with other models of the International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium prognostic model: a population-based study. *The Lancet Oncology*. 2013;14(2):141-8.
53. Choueiri TK, Escudier B, Powles T, Mainwaring PN, Rini BI, Donskov F, et al. Cabozantinib versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2015;373(19):1814-23.
54. Choueiri TK, Escudier B, Powles T, Tannir NM, Mainwaring PN, Rini BI, et al. Cabozantinib versus everolimus in advanced renal cell carcinoma (METEOR): final results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2016;17(7):917-27.
55. Choueiri TK, Hessel C, Halabi S, Sanford B, Michaelson MD, Hahn O, et al. Cabozantinib versus sunitinib as initial therapy for metastatic renal cell carcinoma of intermediate or poor risk (Alliance A031203 CABOSUN randomised trial): Progression-free survival by independent review and overall survival update. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2018;94:115-25.
56. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2015;373(19):1803-13.
57. Motzer RJ, Hutson TE, Cella D, Reeves J, Hawkins R, Guo J, et al. Pazopanib versus sunitinib in metastatic renal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2013;369(8):722-31.
58. Motzer RJ, Hutson TE, Glen H, Michaelson MD, Molina A, Eisen T, et al. Lenvatinib, everolimus, and the combination in patients with metastatic renal cell carcinoma: a randomised, phase 2, open-label, multicentre trial. *The Lancet Oncology*. 2015;16(15):1473-82.
59. Motzer RJ, Hutson TE, Ren M, Dutcus C, Larkin J. Independent assessment of lenvatinib plus everolimus in patients with metastatic renal cell carcinoma. *The Lancet Oncology*. 2016;17(1):e4-5.

60. Motzer RJ, Nosov D, Eisen T, Bondarenko I, Lesovoy V, Lipatov O, et al. Tivozanib versus sorafenib as initial targeted therapy for patients with metastatic renal cell carcinoma: results from a phase III trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(30):3791-9.
61. Motzer RJ, Penkov K, Haanen J, Rini B, Albiges L, Campbell MT, et al. Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2019;380(12):1103-15.
62. Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, Arén Frontera O, Melichar B, Choueiri TK, et al. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2018;378(14):1277-90.
63. Rini BI, Plimack ER, Stus V, Gafanov R, Hawkins R, Nosov D, et al. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2019;380(12):1116-27.
64. Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, et al. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet (London, England)*. 2007;370(9605):2103-11.
65. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2007;356(22):2271-81.
66. Cindolo L, de la Taille A, Messina G, Romis L, Abbou CC, Altieri V, et al. A preoperative clinical prognostic model for non-metastatic renal cell carcinoma. *BJU international*. 2003;92(9):901-5.
67. Cindolo L, Patard JJ, Chiodini P, Schips L, Ficarra V, Tostain J, et al. Comparison of predictive accuracy of four prognostic models for nonmetastatic renal cell carcinoma after nephrectomy: a multicenter European study. *Cancer*. 2005;104(7):1362-71.
68. Yaycioglu O, Roberts WW, Chan T, Epstein JI, Marshall FF, Kavoussi LR. Prognostic assessment of nonmetastatic renal cell carcinoma: a clinically based model. *Urology*. 2001;58(2):141-5.
69. Cindolo L, Chiodini P, Gallo C, Ficarra V, Schips L, Tostain J, et al. Validation by calibration of the UCLA integrated staging system prognostic model for nonmetastatic renal cell carcinoma after nephrectomy. *Cancer*. 2008;113(1):65-71.
70. Frank I, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H. An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: the SSIGN score. *The Journal of urology*. 2002;168(6):2395-400.

71. Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Frank I, Kwon ED, et al. Prediction of progression after radical nephrectomy for patients with clear cell renal cell carcinoma: a stratification tool for prospective clinical trials. *Cancer*. 2003;97(7):1663-71.
72. Pichler M, Hutterer GC, Chromecki TF, Jesche J, Kampel-Kettner K, Rehak P, et al. External validation of the Leibovich prognosis score for nonmetastatic clear cell renal cell carcinoma at a single European center applying routine pathology. *The Journal of urology*. 2011;186(5):1773-7.
73. Zisman A, Pantuck AJ, Dorey F, Said JW, Shvarts O, Quintana D, et al. Improved prognostication of renal cell carcinoma using an integrated staging system. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001;19(6):1649-57.
74. Zisman A, Pantuck AJ, Wieder J, Chao DH, Dorey F, Said JW, et al. Risk group assessment and clinical outcome algorithm to predict the natural history of patients with surgically resected renal cell carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002;20(23):4559-66.
75. GmbH BI. Metastase, die: Bibliographisches Institut GmbH; 2021 [cited 2021 09.03.]. Available from: <https://www.duden.de/rechtschreibung/Metastase>.
76. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science (New York, NY)*. 2011;331(6024):1559-64.
77. Turajlic S, Swanton C. Metastasis as an evolutionary process. *Science (New York, NY)*. 2016;352(6282):169-75.
78. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
79. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(8):563-72.
80. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
81. Alizadeh AM, Shiri S, Farsinejad S. Metastasis review: from bench to bedside. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014;35(9):8483-523.
82. Wan L, Pantel K, Kang Y. Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic. *Nature medicine*. 2013;19(11):1450-64.
83. Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *The Journal of cell biology*. 2010;188(1):11-9.
84. Brabletz T. To differentiate or not--routes towards metastasis. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(6):425-36.
85. Scheel C, Weinberg RA. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Seminars in cancer biology*. 2012;22(5-6):396-403.

86. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704-15.
87. Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PloS one*. 2008;3(8):e2888.
88. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871-90.
89. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental cell*. 2008;14(6):818-29.
90. Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(31):5287-97.
91. Zhang M, Zhu GY, Gao HY, Zhao SP, Xue Y. Expression of tissue levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gastric adenocarcinoma. *Journal of surgical oncology*. 2011;103(3):243-7.
92. Reymond N, Im JH, Garg R, Vega FM, Borda d'Agua B, Riou P, et al. Cdc42 promotes transendothelial migration of cancer cells through beta1 integrin. *The Journal of cell biology*. 2012;199(4):653-68.
93. Sonoshita M, Aoki M, Fuwa H, Aoki K, Hosogi H, Sakai Y, et al. Suppression of colon cancer metastasis by Aes through inhibition of Notch signaling. *Cancer cell*. 2011;19(1):125-37.
94. Wirtz D. Particle-tracking microrheology of living cells: principles and applications. *Annual review of biophysics*. 2009;38:301-26.
95. Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nature medicine*. 2011;17(11):1359-70.
96. Nash GF, Turner LF, Scully MF, Kakkar AK. Platelets and cancer. *The Lancet Oncology*. 2002;3(7):425-30.
97. Chao MP, Weissman IL, Majeti R. The CD47-SIRPalpha pathway in cancer immune evasion and potential therapeutic implications. *Current opinion in immunology*. 2012;24(2):225-32.
98. Blood CH, Zetter BR. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochimica et biophysica acta*. 1990;1032(1):89-118.
99. Brooks SA, Lomax-Browne HJ, Carter TM, Kinch CE, Hall DM. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta histochemica*. 2010;112(1):3-25.
100. Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Mannel DN. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer research*. 1999;59(6):1295-300.

101. Yilmaz M, Christofori G, Lehembre F. Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis. *Trends in molecular medicine*. 2007;13(12):535-41.
102. Gupta GP, Nguyen DX, Chiang AC, Bos PD, Kim JY, Nadal C, et al. Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature*. 2007;446(7137):765-70.
103. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. 2005;436(7050):518-24.
104. Padua D, Zhang XH, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR, et al. TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell*. 2008;133(1):66-77.
105. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. 2011;147(2):275-92.
106. Weis SM, Cheresh DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature*. 2005;437(7058):497-504.
107. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(6):453-8.
108. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer metastasis reviews*. 1989;8(2):98-101.
109. Grange C, Tapparo M, Collino F, Vitillo L, Damasco C, Deregibus MC, et al. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer research*. 2011;71(15):5346-56.
110. Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, Maru Y. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nature cell biology*. 2006;8(12):1369-75.
111. Hiratsuka S, Watanabe A, Sakurai Y, Akashi-Takamura S, Ishibashi S, Miyake K, et al. The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nature cell biology*. 2008;10(11):1349-55.
112. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. 2005;438(7069):820-7.
113. Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature medicine*. 2012;18(6):883-91.
114. Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(4):285-93.
115. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010;141(1):52-67.

116. Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*. 2009;139(5):891-906.
117. Celia-Terrassa T, Meca-Cortes O, Mateo F, Martinez de Paz A, Rubio N, Arnal-Estape A, et al. Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(5):1849-68.
118. Ocana OH, Corcoles R, Fabra A, Moreno-Bueno G, Acloque H, Vega S, et al. Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer cell*. 2012;22(6):709-24.
119. Tsai JH, Donaher JL, Murphy DA, Chau S, Yang J. Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer cell*. 2012;22(6):725-36.
120. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141(1):39-51.
121. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine*. 2013;19(11):1423-37.
122. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(11):834-46.
123. Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*. 1987;48(4):549-54.
124. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992;69(1):11-25.
125. Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome biology*. 2007;8(5):215.
126. Luo BH, Springer TA. Integrin structures and conformational signaling. *Current opinion in cell biology*. 2006;18(5):579-86.
127. Bogenrieder T, Herlyn M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene*. 2003;22(42):6524-36.
128. Gahmberg CG, Fagerholm SC, Nurmi SM, Chavakis T, Marchesan S, Gronholm M. Regulation of integrin activity and signalling. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1790(6):431-44.
129. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002;110(6):673-87.
130. Kim M, Carman CV, Springer TA. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science (New York, NY)*. 2003;301(5640):1720-5.
131. Bialkowska K, Qin J, Plow EF. Phosphorylation of Kindlins and the Control of Integrin Function. *Cells*. 2021;10(4).
132. Xiong JP, Stehle T, Zhang R, Joachimiak A, Frech M, Goodman SL, et al. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science (New York, NY)*. 2002;296(5565):151-5.

133. Sani S, Messe M, Fuchs Q, Pierrevelcin M, Laquerriere P, Entz-Werle N, et al. Biological Relevance of RGD-Integrin Subtype-Specific Ligands in Cancer. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*. 2021;22(7):1151-60.
134. Schumacher S, Dedden D, Nunez RV, Matoba K, Takagi J, Biertümpfel C, et al. Structural insights into integrin $\alpha(5)\beta(1)$ opening by fibronectin ligand. *Science advances*. 2021;7(19).
135. Luo BH, Carman CV, Springer TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annual review of immunology*. 2007;25:619-47.
136. Hu P, Luo BH. Integrin bi-directional signaling across the plasma membrane. *Journal of cellular physiology*. 2013;228(2):306-12.
137. Schwartz MA. Integrin signaling revisited. *Trends in cell biology*. 2001;11(12):466-70.
138. Zaidel-Bar R, Geiger B. The switchable integrin adhesome. *Journal of cell science*. 2010;123(Pt 9):1385-8.
139. Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annual review of cell and developmental biology*. 1996;12:463-518.
140. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science (New York, NY)*. 1999;285(5430):1028-32.
141. Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase. *Progress in biophysics and molecular biology*. 1999;71(3-4):435-78.
142. Hou J, Yan D, Liu Y, Huang P, Cui H. The Roles of Integrin $\alpha5\beta1$ in Human Cancer. *OncoTargets and therapy*. 2020;13:13329-44.
143. Gong J, Wang D, Sun L, Zborowska E, Willson JK, Brattain MG. Role of alpha 5 beta 1 integrin in determining malignant properties of colon carcinoma cells. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 1997;8(1):83-90.
144. McFarlane S, McFarlane C, Montgomery N, Hill A, Waugh DJ. CD44-mediated activation of alpha5beta1-integrin, cortactin and paxillin signaling underpins adhesion of basal-like breast cancer cells to endothelium and fibronectin-enriched matrices. *Oncotarget*. 2015;6(34):36762-73.
145. Adachi M, Taki T, Higashiyama M, Kohno N, Inufusa H, Miyake M. Significance of integrin alpha5 gene expression as a prognostic factor in node-negative non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6(1):96-101.
146. Mallawaarachy DM, Buckland ME, McDonald KL, Li CC, Ly L, Sykes EK, et al. Membrane proteome analysis of glioblastoma cell invasion. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2015;74(5):425-41.

147. Qian F, Zhang ZC, Wu XF, Li YP, Xu Q. Interaction between integrin alpha(5) and fibronectin is required for metastasis of B16F10 melanoma cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;333(4):1269-75.
148. Breuksch I, Prosinger F, Baehr F, Engelhardt FP, Bauer HK, Thuroff JW, et al. Integrin alpha5 triggers the metastatic potential in renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(64):107530-42.
149. Haber T, Jockel E, Roos FC, Junker K, Prawitt D, Hampel C, et al. Bone Metastasis in Renal Cell Carcinoma is Preprogrammed in the Primary Tumor and Caused by AKT and Integrin alpha5 Signaling. *The Journal of urology*. 2015;194(2):539-46.
150. Hase H, Jingushi K, Ueda Y, Kitae K, Egawa H, Ohshio I, et al. LOXL2 status correlates with tumor stage and regulates integrin levels to promote tumor progression in ccRCC. *Molecular cancer research : MCR*. 2014;12(12):1807-17.
151. Camacho-Leal P, Zhai AB, Stanners CP. A co-clustering model involving alpha5beta1 integrin for the biological effects of GPI-anchored human carcinoembryonic antigen (CEA). *Journal of cellular physiology*. 2007;211(3):791-802.
152. Reyes-Reyes ME, George MD, Roberts JD, Akiyama SK. P-selectin activates integrin-mediated colon carcinoma cell adhesion to fibronectin. *Experimental cell research*. 2006;312(20):4056-69.
153. Jia Y, Zeng ZZ, Markwart SM, Rockwood KF, Ignatoski KM, Ethier SP, et al. Integrin fibronectin receptors in matrix metalloproteinase-1-dependent invasion by breast cancer and mammary epithelial cells. *Cancer research*. 2004;64(23):8674-81.
154. Qin L, Chen X, Wu Y, Feng Z, He T, Wang L, et al. Steroid receptor coactivator-1 upregulates integrin alpha(5) expression to promote breast cancer cell adhesion and migration. *Cancer research*. 2011;71(5):1742-51.
155. Huang C, Verhulst S, Shen Y, Bu Y, Cao Y, He Y, et al. AKR1B10 promotes breast cancer metastasis through integrin alpha5/delta-catenin mediated FAK/Src/Rac1 signaling pathway. *Oncotarget*. 2016;7(28):43779-91.
156. Li XQ, Lu JT, Tan CC, Wang QS, Feng YM. RUNX2 promotes breast cancer bone metastasis by increasing integrin alpha5-mediated colonization. *Cancer letters*. 2016;380(1):78-86.
157. Dong Y, Tan OL, Loessner D, Stephens C, Walpole C, Boyle GM, et al. Kallikrein-related peptidase 7 promotes multicellular aggregation via the alpha(5)beta(1) integrin pathway and paclitaxel chemoresistance in serous epithelial ovarian carcinoma. *Cancer research*. 2010;70(7):2624-33.
158. Sawada K, Mitra AK, Radjabi AR, Bhaskar V, Kistner EO, Tretiakova M, et al. Loss of E-cadherin promotes ovarian cancer

- metastasis via alpha 5-integrin, which is a therapeutic target. *Cancer research*. 2008;68(7):2329-39.
159. Paulus W, Baur I, Schuppan D, Roggendorf W. Characterization of integrin receptors in normal and neoplastic human brain. *The American journal of pathology*. 1993;143(1):154-63.
160. Etienne-Selloum N, Prades J, Bello-Roufai D, Boone M, Sevestre H, Trudel S, et al. Expression Analysis of $\alpha 5$ Integrin Subunit Reveals Its Upregulation as a Negative Prognostic Biomarker for Glioblastoma. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*. 2021;14(9).
161. Fogh J, Wright WC, Loveless JD. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. 1977;58(2):209-14.
162. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. 1973;51(5):1417-23.
163. ATCC ATCC. Zelllinien Manassas, Virginia, USA: ATCC, American Type Culture Collection; [Available from: <https://www.lgcstandards-atcc.org>].
164. Collection ATC. American Type Culture Collection. 2020.
165. Hashimura T, Tubbs RR, Connelly R, Caulfield MJ, Trindade CS, McMahon JT, et al. Characterization of two cell lines with distinct phenotypes and genotypes established from a patient with renal cell carcinoma. *Cancer research*. 1989;49(24 Pt 1):7064-71.
166. Thiede MA, Strewler GJ, Nissenson RA, Rosenblatt M, Rodan GA. Human renal carcinoma expresses two messages encoding a parathyroid hormone-like peptide: evidence for the alternative splicing of a single-copy gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(13):4605-9.
167. Williams RD, Elliott AY, Stein N, Fraley EE. In vitro cultivation of human renal cell cancer. I. Establishment of cells in culture. *In vitro*. 1976;12(9):623-7.
168. Williams RD, Elliott AY, Stein N, Fraley EE. In vitro cultivation of human renal cell cancer. II. Characterization of cell lines. *In vitro*. 1978;14(9):779-86.
169. Schneider E, Keppler R, Prawitt D, Steinwender C, Roos FC, Thuroff JW, et al. Migration of renal tumor cells depends on dephosphorylation of Shc by PTEN. *International journal of oncology*. 2011;38(3):823-31.
170. Corporation P. CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay 2019 [cited 2019. Available from: https://www.promega.de/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter_glo-luminescent-cell-viability-assay/?catNum=G7570#protocols].

171. Corporation P. 2019 [updated 08/19; cited 2019 22.10.19]. Available from: <https://www.promega.de/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltox-green-cytotoxicity-assay/?catNum=G8741>.
172. Suehiro K, Gailit J, Plow EF. Fibrinogen is a ligand for integrin alpha5beta1 on endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(8):5360-6.
173. Herrick S, Blanc-Brude O, Gray A, Laurent G. Fibrinogen. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 1999;31(7):741-6.
174. Abdel-Ghany M, Cheng HC, Elble RC, Pauli BU. The breast cancer beta 4 integrin and endothelial human CLCA2 mediate lung metastasis. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(27):25438-46.
175. Dent P. Crosstalk between ERK, AKT, and cell survival. *Cancer biology & therapy*. 2014;15(3):245-6.
176. Hamidi H, Ivaska J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nature reviews Cancer*. 2018;18(9):533-48.
177. Baehr F. Der Integrin alpha-5-Signalweg als Prognostikator für die Progression des Nierenzellkarzinoms - eine Expressionsanalyse von Signalmediatoren. unv Diss, Universität Mainz. 2015.
178. Sinha R, Winer AG, Chevinsky M, Jakubowski C, Chen YB, Dong Y, et al. Analysis of renal cancer cell lines from two major resources enables genomics-guided cell line selection. *Nature communications*. 2017;8:15165.
179. Nguyen DX, Bos PD, Massague J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(4):274-84.
180. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science*. 2010;123(Pt 24):4195-200.
181. Obara M, Yoshizato K. Possible involvement of the interaction of the alpha 5 subunit of alpha 5 beta 1 integrin with the synergistic region of the central cell-binding domain of fibronectin in cells to fibronectin binding. *Experimental cell research*. 1995;216(1):273-6.
182. Pereira M, Rybarczyk BJ, Odrliin TM, Hocking DC, Sottile J, Simpson-Haidaris PJ. The incorporation of fibrinogen into extracellular matrix is dependent on active assembly of a fibronectin matrix. *Journal of cell science*. 2002;115(Pt 3):609-17.
183. Sahni A, Odrliin T, Francis CW. Binding of basic fibroblast growth factor to fibrinogen and fibrin. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(13):7554-9.
184. Sahni A, Francis CW. Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulates endothelial cell proliferation. *Blood*. 2000;96(12):3772-8.
185. Konstantopoulos K, Thomas SN. Cancer cells in transit: the vascular interactions of tumor cells. *Annual review of biomedical engineering*. 2009;11:177-202.

186. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003;4(1):33-45.
187. Pankov R, Cukierman E, Katz BZ, Matsumoto K, Lin DC, Lin S, et al. Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of alpha(5)beta(1) integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis. *The Journal of cell biology*. 2000;148(5):1075-90.
188. Hynes RO, Destree AT. Relationships between fibronectin (LETS protein) and actin. *Cell*. 1978;15(3):875-86.
189. Bass MD, Morgan MR, Roach KA, Settleman J, Goryachev AB, Humphries MJ. p190RhoGAP is the convergence point of adhesion signals from alpha 5 beta 1 integrin and syndecan-4. *The Journal of cell biology*. 2008;181(6):1013-26.
190. Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell*. 2004;116(2):167-79.
191. Ju JA, Godet I, Ye IC, Byun J, Jayatilaka H, Lee SJ, et al. Hypoxia Selectively Enhances Integrin alpha5beta1 Receptor Expression in Breast Cancer to Promote Metastasis. *Molecular cancer research : MCR*. 2017;15(6):723-34.
192. Benbrook DM, Masamha CP. The pro-survival function of Akt kinase can be overridden or altered to contribute to induction of apoptosis. *Current cancer drug targets*. 2011;11(5):586-99.
193. Brenner W, Greber I, Gudejko-Thiel J, Beitz S, Schneider E, Walenta S, et al. Migration of renal carcinoma cells is dependent on protein kinase Cdelta via beta1 integrin and focal adhesion kinase. *International journal of oncology*. 2008;32(5):1125-31.
194. Tanimura S, Takeda K. ERK signalling as a regulator of cell motility. *Journal of biochemistry*. 2017;162(3):145-54.
195. Howe AK, Aplin AE, Juliano RL. Anchorage-dependent ERK signaling--mechanisms and consequences. *Current opinion in genetics & development*. 2002;12(1):30-5.
196. Peng XD, Xu PZ, Chen ML, Hahn-Windgassen A, Skeen J, Jacobs J, et al. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes & development*. 2003;17(11):1352-65.
197. Sayama K, Yamasaki K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Ijuin T, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase is a key regulator of early phase differentiation in keratinocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(43):40390-6.
198. Weng L, Enomoto A, Ishida-Takagishi M, Asai N, Takahashi M. Girding for migratory cues: roles of the Akt substrate Girdin in cancer progression and angiogenesis. *Cancer science*. 2010;101(4):836-42.
199. Deng B, Zhang S, Miao Y, Han Z, Zhang X, Wen F, et al. Adrenomedullin expression in epithelial ovarian cancers and promotes

- HO8910 cell migration associated with upregulating integrin alpha5beta1 and phosphorylating FAK and paxillin. *Journal of experimental & clinical cancer research* : CR. 2012;31:19.
200. Tanaka T, Yamaguchi R, Sabe H, Sekiguchi K, Healy JM. Paxillin association in vitro with integrin cytoplasmic domain peptides. *FEBS letters*. 1996;399(1-2):53-8.
201. Turner CE, Miller JT. Primary sequence of paxillin contains putative SH2 and SH3 domain binding motifs and multiple LIM domains: identification of a vinculin and pp125Fak-binding region. *Journal of cell science*. 1994;107 (Pt 6):1583-91.
202. Han J, Rose DM, Woodside DG, Goldfinger LE, Ginsberg MH. Integrin alpha 4 beta 1-dependent T cell migration requires both phosphorylation and dephosphorylation of the alpha 4 cytoplasmic domain to regulate the reversible binding of paxillin. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(37):34845-53.
203. Hyduk SJ, Oh J, Xiao H, Chen M, Cybulsky MI. Paxillin selectively associates with constitutive and chemoattractant-induced high-affinity alpha4beta1 integrins: implications for integrin signaling. *Blood*. 2004;104(9):2818-24.
204. Schmid RS, Pruitt WM, Maness PF. A MAP kinase-signaling pathway mediates neurite outgrowth on L1 and requires Src-dependent endocytosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000;20(11):4177-88.
205. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2:489.
206. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999;96(6):857-68.
207. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997;91(2):231-41.
208. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science (New York, NY)*. 1998;282(5392):1318-21.
209. Krishna M, Narang H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2008;65(22):3525-44.
210. Chu B, Soncin F, Price BD, Stevenson MA, Calderwood SK. Sequential phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3 represses transcriptional activation by heat shock factor-1. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(48):30847-57.

211. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes & development*. 1998;12(22):3499-511.
212. Sigoillot FD, Evans DR, Guy HI. Growth-dependent regulation of mammalian pyrimidine biosynthesis by the protein kinase A and MAPK signaling cascades. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(18):15745-51.
213. Zassadowski F, Rochette-Egly C, Chomienne C, Cassinat B. Regulation of the transcriptional activity of nuclear receptors by the MEK/ERK1/2 pathway. *Cellular signalling*. 2012;24(12):2369-77.
214. Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(11):859-68.
215. Burotto M, Chiou VL, Lee JM, Kohn EC. The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer*. 2014;120(22):3446-56.
216. Graff JR, Konicek BW, McNulty AM, Wang Z, Houck K, Allen S, et al. Increased AKT activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27Kip1 expression. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(32):24500-5.
217. Li N, Zhang Y, Naylor MJ, Schatzmann F, Maurer F, Wintermantel T, et al. Beta1 integrins regulate mammary gland proliferation and maintain the integrity of mammary alveoli. *The EMBO journal*. 2005;24(11):1942-53.
218. Markovic-Lipkovski J, Brasanac D, Muller GA, Muller CA. Cadherins and integrins in renal cell carcinoma: an immunohistochemical study. *Tumori*. 2001;87(3):173-8.
219. Lee JW, Juliano RL. α 5 β 1 integrin protects intestinal epithelial cells from apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B-dependent pathway. *Molecular biology of the cell*. 2000;11(6):1973-87.
220. Zhou X, Zhai Y, Liu C, Yang G, Guo J, Li G, et al. Sialidase NEU1 suppresses progression of human bladder cancer cells by inhibiting fibronectin-integrin α 5 β 1 interaction and Akt signaling pathway. *Cell communication and signaling : CCS*. 2020;18(1):44.
221. Bell-McGuinn KM, Matthews CM, Ho SN, Barve M, Gilbert L, Penson RT, et al. A phase II, single-arm study of the anti- α 5 β 1 integrin antibody volociximab as monotherapy in patients with platinum-resistant advanced epithelial ovarian or primary peritoneal cancer. *Gynecologic oncology*. 2011;121(2):273-9.
222. Bhaskar V, Fox M, Breinberg D, Wong MH, Wales PE, Rhodes S, et al. Volociximab, a chimeric integrin α 5 β 1 antibody, inhibits the growth of VX2 tumors in rabbits. *Investigational new drugs*. 2008;26(1):7-12.

223. Ricart AD, Tolcher AW, Liu G, Holen K, Schwartz G, Albertini M, et al. Volociximab, a chimeric monoclonal antibody that specifically binds $\alpha 5\beta 1$ integrin: a phase I, pharmacokinetic, and biological correlative study. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(23):7924-9.
224. Besse B, Tsao LC, Chao DT, Fang Y, Soria JC, Almokadem S, et al. Phase Ib safety and pharmacokinetic study of volociximab, an anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin antibody, in combination with carboplatin and paclitaxel in advanced non-small-cell lung cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2013;24(1):90-6.
225. Yazji S, Bukowski R, Kondagunta V, Figlin R. Final results from phase II study of volociximab, an $\alpha 5\beta 1$ anti-integrin antibody, in refractory or relapsed metastatic clear cell renal cell carcinoma (mCCRCC). *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(18_suppl):5094-.
226. Bell-McGuinn KM, Matthews CM, Ho SN, Barve M, Gilbert L, Penson RT, et al. A phase II, single-arm study of the anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin antibody volociximab as monotherapy in patients with platinum-resistant advanced epithelial ovarian or primary peritoneal cancer. *Gynecologic oncology*. 2011;121(2):273-9.
227. Besse B, Almokadem S, Planchard D, Chico I, Tsao C, Ringeisen F, et al. Safety and early efficacy results from a phase I study of volociximab (V) in combination with carboplatin (C) and paclitaxel (P) in patients (pts) with advanced non small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(15_suppl):e13513-e.
228. Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nature medicine*. 2001;7(11):1194-201.
229. Barton J. A multicenter phase II study of volociximab in patients with relapsed metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(15_suppl):9051-.
230. Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, Bambino K, McDonnell K, Mittal V. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science (New York, NY)*. 2008;319(5860):195-8.
231. Shaked Y, Ciarrocchi A, Franco M, Lee CR, Man S, Cheung AM, et al. Therapy-induced acute recruitment of circulating endothelial progenitor cells to tumors. *Science (New York, NY)*. 2006;313(5794):1785-7.
232. Yu P, Ge YZ, Zhao Y, Wu JP, Wu R, Zhou LH, et al. Identification and significance of mobilized endothelial progenitor cells in tumor neovascularization of renal cell carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014;35(9):9331-41.

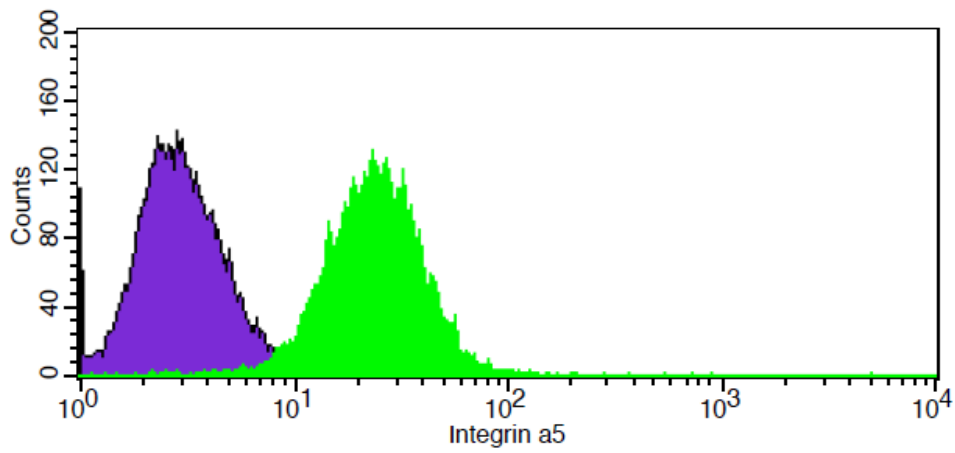
7. Literaturverzeichnis

8. Anhang

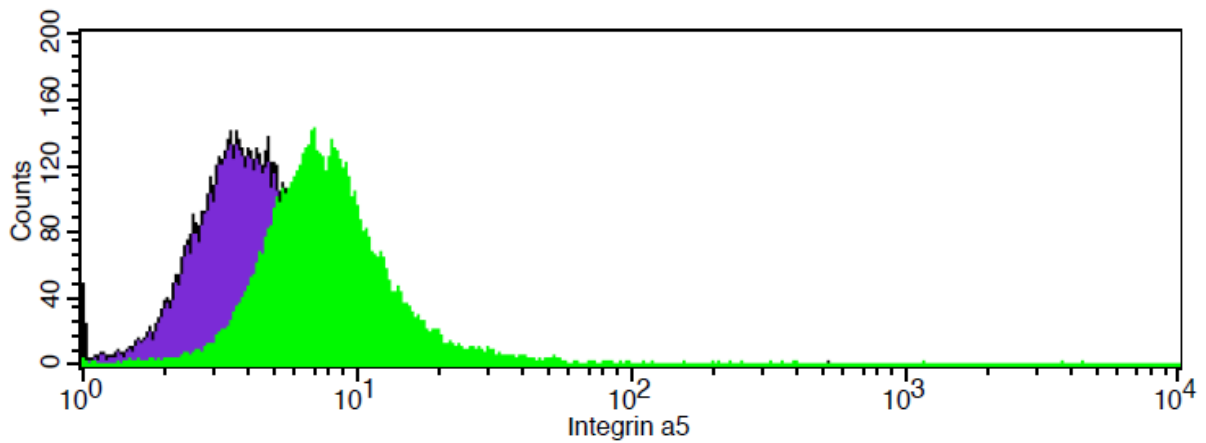
8.1. FACS

Zellreihe	CCF-RC1	786-O	A-498	Caki-1	Caki-2
Isotypenkontrolle	3,31	4,97	3,9	3,26	4,39
Integrin $\alpha 5$ Messung	26,55	9,55	14,1	31,48	12,87
Relative Integrinexpression	23,24	4,58	10,2	28,22	8,48

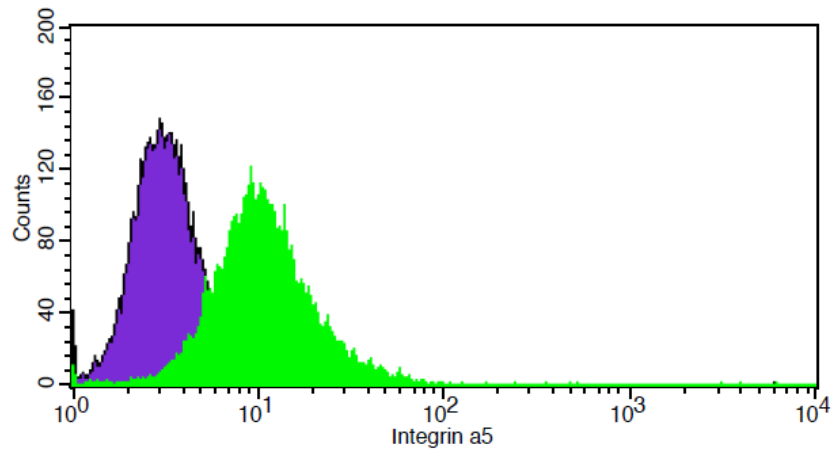
CCF-RC1



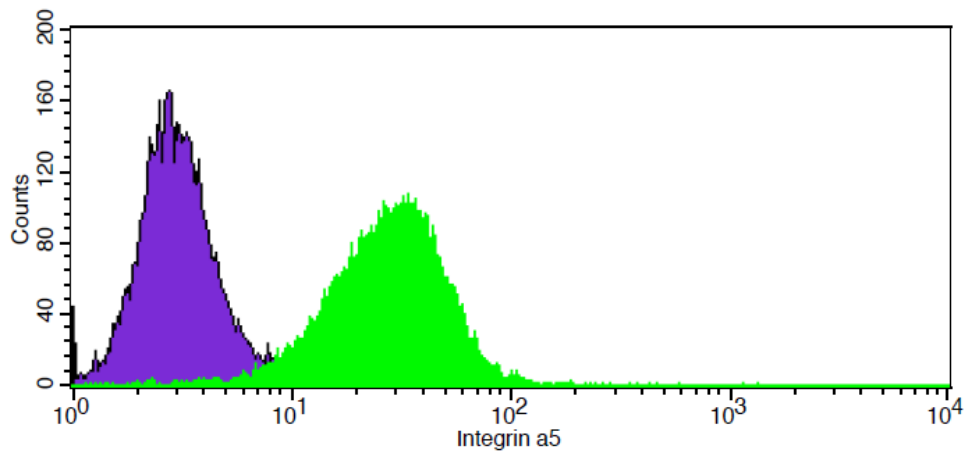
786-O



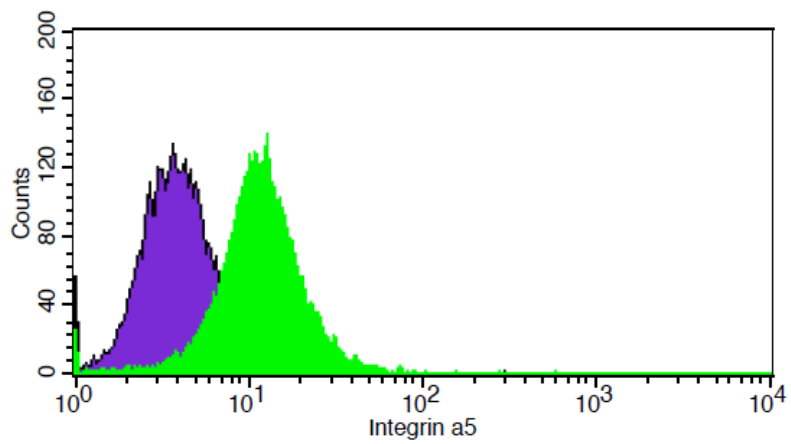
A-498



Caki-1



Caki-2



8.2 Migration**8.2.1 Migration für Fibrinogenstandardreihe****Caki-1**

	HM	FN 10 µg/ml	FB 20 µg/ml	FB 50 µg/ml	FB 100 µg/ml	FB 200 µg/ml
Mittelwert	18,75	499	15	10	13,75	7,75
% FN 10 µg/ml	3,76	100,00	3,01	2,00	2,76	1,55

CCF-RC1

	HM	FN 10 µg/ml	FB 20 µg/ml	FB 50 µg/ml	FB 100 µg/ml	FB 200 µg/ml
Mittelwert	0,5	1231,75	36,75	44	42	28,33
% FN 10 µg/ml	0,04	100,00	2,98	3,57	3,41	2,30

8.1.2.3 Migration für Fibronektin (10 µg/ml)**Caki-1**

	Kontrolle HM	Kontrolle FN	Isotyp	P1D6 10 µg/ml	P1D6 20 µg/ml
Untersuchung 1	4,76	100,00	110,68	63,88	47,19
2	4,28	100,00	101,01	39,93	18,96
3	6,53	100,00	94,60	50,35	55,31
Mittelwert	5,19	100,00	102,10	51,39	40,48
Standardabweichung	1,18	0,00	8,09	12,01	19,08

CCF-RC1

	Kontrolle HM	Kontrolle FN	Isotyp	P1D6 10 µg/ml	P1D6 20 µg/ml
Untersuchung 1	5,39	100,00	62,95	16,90	12,44
2	0,32	100,00	82,07	36,27	18,84
3	0,32	100,00	82,13	35,33	37,62
Mittelwert	2,01	100,00	75,72	29,50	22,97
Standardabweichung	2,92	0,00	11,06	10,92	13,09

p-Wert

gegenüber Isokontrolle

0,000042

0,01

gegenüber P1D6 10 µg/ml

0,38

8.3 Adhäsion

8.3.1 Adhäsion gegenüber Fibronectin (10 µg/ml), Laminin (50 µg/ml), Kollagen IV (10 µg/ml)

8. Anhang

Caki-1		Laminin		Fibronektin		Kollagen IV							
BSA		Kontrolle	Isotyp	Kontrolle	Isotyp	Kontrolle	Isotyp						
1	100	97,716992	129,9124107	100	116,726646	112,2818495	100	92,3337424	58,85788749	100	122,32355	111,8747923	
2	100	86,7922618	90,97328481	100	96,19075	100,6241081	100	89,089071	42,2926051	100	106,71346	61,75315252	
3	100	100,500159	102,0422153	100	75,479817	59,97952366	100	105,752495	66,75829495	100	119,188104	61,98483471	
Mittelwert		100	95,0031377	107,642637	100	96,1324043	90,96182706	100	95,7251028	55,96959585	100	116,075038	78,53759319
Standardabweichung des Mittelwerts		0	7,24571366	20,06458132	0	20,6234763	27,45729551	0	8,83421872	12,48595877	0	8,25754917	28,87109375
p-Wert gg. Isotyp			0,326441216			0,464478718			0,009315492			0,115464854	
CCF-RC1		Laminin		Fibronektin		Kollagen IV							
BSA		Kontrolle	Isotyp	Kontrolle	Isotyp	Kontrolle	Isotyp						
1	100	88,6663644	84,47626654	100	100,420352	95,21282535	100	96,0501368	55,52973646	100	108,754541	115,9438222	
2	100	112,9869	121,7410869	100	107,013513	104,0441427	100	98,845162	33,40968473	100	104,932705	91,42754017	
3	100	91,650414	91,29116226	100	88,9608931	104,4448367	100	87,2816247	49,82113019	100	102,624181	117,2972194	
Mittelwert		100	97,7678927	99,16950525	100	98,7982529	101,2339349	100	94,0589745	46,25351712	100	105,437143	108,2228666
Standardabweichung des Mittelwerts		0	13,264229	19,84232663	0	9,13497009	5,218281249	0	6,03343965	11,4834694	0	3,09615437	14,56090697
p-Wert gg. Isotyp			0,750033039			0,745918945			0,032668765			0,772388523	

8.3.2 Adhäsion gegenüber Fibrinogen nach Standardreihe

8. Anhang

BSA	FN 10 µg/ml	FB 10 µg/ml	FB 20 µg/ml	FB 50 µg/ml	FB 100 µg/ml	FB 200 µg/ml	FB 500 µg/ml	FB 1 mg/ml	FB 2 mg/ml
0,1470263	1,4575116	0,5412432	0,6174233	0,5980669	0,4792724	0,6969192	0,8785276	1,061457	0,7514128
0,1327942	1,5408686	0,6944756	0,4584679	0,4244943	0,4367639	0,6447023	0,9230826	1,061299	1,0866807
0,1084029	1,6849893	0,447818	0,5865256	0,6641746	0,485695	0,8623357	0,9252222	1,0097163	1,1415446
0,1343899	1,5367396	0,8663477	0,7456154	0,6504226	0,38536	0,6278916	0,7601324	0,9321758	0,7317924
0,0857066	0,1800073	0,1037148	0,0889547	0,096086	0,1209734	0,1510468	0,1545867	0,1591496	0,16961
0,0860382	0,128625	0,0700958	0,089018	0,1412955	0,1492079	0,1594477	0,1740384	0,1902216	0,1820963
0,101166	0,1654903	0,0806015	0,1063085	0,1500192	0,1639835	0,1827508	0,2068736	0,1677775	0,1426078
0,1293037	0,1465822	0,1021766	0,1633176	0,1688694	0,1557392	0,1793758	0,170907	0,2067019	0,2086087

RC-1

Mittelwert der Messung:

Caki-1	0,13065333	1,55502728	0,63747113	0,60200805	0,5842896	0,44677283	0,7079622	0,8717412	1,01616203	0,92785763
RC-1	0,10055363	0,1551762	0,08914718	0,1118997	0,13906753	0,147476	0,16815528	0,17660143	0,18096265	0,1757307

% FN 10 µg/ml

Caki-1	8,40199571	100	40,9942086	38,713665	37,5742348	28,7308674	45,5273172	56,059544	65,346894	59,6682541
RC-1	64,7996439	100	57,4489999	72,1113805	89,6191072	95,03777	108,364089	113,80703	116,617529	113,24591

8.3.3 Adhäsion gegenüber Fibrinogen 1 mg/ml

8. Anhang

Caki-1		Fibronektin 10 µg/ml			Fibrinogen 1mg/ml				
% der Kontrolle	Kontrolle	Isotyp	P1D6 10 µg/ml	Kontrolle	Isotyp	P1D6 10 µg/ml	Kontrolle	Isotyp	P1D6 10 µg/ml
1	100	94,5463977	91,5730186	100	106,815977	92,10260405	100	103,356702	67,64169568
2	100	60,2197902	56,84820882	100	83,3602139	38,51436724	100	94,7105212	53,86901874
3	100	83,6796611	68,45086646	100	114,740624	70,48788716	100	93,698676	80,91823636

Mittelwert 100 79,4819497 72,29069796 100 101,638938 67,03495282 100 97,2552998 67,47631693
 Standardabweichung des Mittelwerts 0 17,5440754 17,67799007 0 16,3182056 26,96046824 0 5,30813442 13,52536713
 p-Wert gg. Isotyp 0,21556422 0,073617482

BSA		Fibronektin 10 µg/ml			Fibrinogen 1mg/ml				
% der Kontrolle	Kontrolle	Isotyp	P1D6 10 µg/ml	Kontrolle	Isotyp	P1D6 10 µg/ml	Kontrolle	Isotyp	P1D6 10 µg/ml
1	100	118,560044	117,7028659	100	122,932686	80,10353661	100	117,673304	53,72931525
2	100	85,1978235	70,12183507	100	121,747619	39,40951901	100	92,3086239	73,91496359
3	100	71,9782043	72,49242984	100	105,762028	76,02523567	100	125,602734	66,77115245

Mittelwert 100 91,912024 86,77237693 100 116,814111 65,17943043 100 111,861554 64,80514376
 Standardabweichung des Mittelwerts 0 24,0057768 26,81280085 0 9,5897079 22,41036335 0 17,3912844 10,23542829
 p-Wert gg. Isotyp 0,41080967 0,082339524 0,082328411

8.4 Westernblot**8.4.1 Expression/Aktivität von Paxillin**

Expression

Caki-1 (% der Kontrolle)

	06.01.2016	19.01.2016	01.03.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	100	100	100	100	0
Fibronectin 10 µg/ml	77,273017	119,43619	114,4868479	103,73202	23,04741
P1D6 10 µg/ml	83,954238	125,8715175	183,0727745	130,96618	49,75528

p-Wert

0,3184415

CCF-RC1 (% der Kontrolle)

	06.01.2016	19.01.2016	01.03.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	100	100	100	100	0
Fibronectin 10 µg/ml	103,6792	139,80046	77,1148441	106,864834	31,46399
P1D6 10 µg/ml	124,8149	152,31943	50,3669472	109,167093	52,74673

p-Wert

0,89019803

Aktivität

Caki-1 (% der Kontrolle)

	06.01.2016	19.01.2016	01.03.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	100	100	100	100	0
Fibronectin 10 µg/ml	152,30555	120,2095905	101,1640461	124,55973	25,84678
P1D6 10 µg/ml	205,21239	125,5170315	142,6375387	157,78899	41,9525

p-Wert

0,1465031

CCF-RC1 (% der Kontrolle)

	06.01.2016	19.01.2016	01.03.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	100	100	100	100	0
Fibronectin 10 µg/ml	98,56499	103,77641	87,6368424	96,6594159	8,236799
P1D6 10 µg/ml	109,40904	107,83043	76,2686575	97,8360438	18,69457

p-Wert

0,87439586

8.4.2 Expression/Aktivität von FAK

Expression

Caki-1 (% der Kontrolle)

	26.02.2016	27.01.2016	23.02.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	100	100	100	100	0
Fibronektin 10 µg/ml	76,436504	80,13539	111,29798	89,2899588	19,14902789
P1D6 10 µg/ml	71,368601	123,53723	99,963826	98,2898845	26,12456596

p-Wert

0,65468797

CCF-RC1 (% der Kontrolle)

	26.02.2016	27.01.2016	23.02.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	100	100	100	100	0
Fibronektin 10 µg/ml	128,99926	93,690527	106,84109	109,843625	17,844831
P1D6 10 µg/ml	94,531007	95,14797	96,423805	95,36759389	0,9653221

p-Wert

0,304247124

Aktivität

Caki-1 (% der Kontrolle)

	26.02.2016	27.01.2016	23.02.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	100	100	100	100	0
Fibronektin 10 µg/ml	104,77451	52,261987	71,426833	76,1544426	26,57355716
P1D6 10 µg/ml	76,732128	102,56223	112,29354	97,1959667	18,37800582

p-Wert

0,48389683

CCF-RC1 (% der Kontrolle)

	26.02.2016	27.01.2016	23.02.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	100	100	100	100	0
Fibronektin 10 µg/ml	86,721438	95,109176	177,64587	119,8254938	50,249231
P1D6 10 µg/ml	37,765033	72,615251	174,28208	94,88745499	70,931406

p-Wert

0,199840509

8.4.3 Expression/Aktivität von SRC

Expression

Caki-1 (% der Kontrolle)

	27.02.2016	28.01.2016	24.02.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	100	100	100	100	0
Fibronectin 10 µg/ml	45,151119	137,00355	97,806093	93,3202531	46,09022924
P1D6 10 µg/ml	41,748689	135,05553	84,957535	87,2539178	46,69578774

p-Wert

0,21783122

CCF-RC1 (% der Kontrolle)

	27.02.2016	28.01.2016	24.02.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	100	100	100	100	0
Fibronectin 10 µg/ml	122,08004	86,212753	150,45519	119,5826616	32,19395
P1D6 10 µg/ml	71,481598	82,215047	135,68131	96,45931729	34,388589

p-Wert

0,127721579

Aktivität

Caki-1 (% der Kontrolle)

	27.02.2016	28.01.2016	24.02.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	100	100	100	100	0
Fibronectin 10 µg/ml	69,939354	160,17426	99,913844	110,009151	45,9567279
P1D6 10 µg/ml	48,611746	122,63614	95,468543	88,9054755	37,44606839

p-Wert

0,15781307

CCF-RC1 (% der Kontrolle)

	27.02.2016	28.01.2016	24.02.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	100	100	100	100	0
Fibronectin 10 µg/ml	72,027296	76,042131	133,80517	93,95819813	34,566826
P1D6 10 µg/ml	23,651537	57,791271	120,13136	67,19138797	48,921984

p-Wert

0,133132162

8.4.4 Expression/Aktivität von SHC

Expression

Caki-1 (% der Kontrolle)

	03.03.2016	02.03.2016	03.03.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	100	100	100	100	0
Fibronektin 10 µg/ml	116,90939	83,075851	108,43541	102,8068844	17,60504
P1D6 10 µg/ml	107,40062	72,680586	104,98433	95,02184465	19,38578

p-Wert 0,0703686

CCF-RC1 (% der Kontrolle)

	03.03.2016	02.03.2016	03.03.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	100	100	100	100	0
Fibronektin 10 µg/ml	96,049872	98,480798	101,14109	98,55725429	2,546471
P1D6 10 µg/ml	87,559834	83,044344	96,902483	89,16888673	7,0678

p-Wert 0,102581592

Aktivität

Caki-1 (% der Kontrolle)

	03.03.2016	02.03.2016	03.03.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	100	100	100	100	0
Fibronektin 10 µg/ml	116,90939	80,877087	117,60637	105,1309483	21,00735
P1D6 10 µg/ml	107,40062	73,626162	114,82535	98,6173767	21,9591

p-Wert 0,08106497

CCF-RC1 (% der Kontrolle)

	03.03.2016	02.03.2016	03.03.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	100	100	100	100	0
Fibronektin 10 µg/ml	96,049872	113,30631	101,44978	103,6019882	8,827239
P1D6 10 µg/ml	87,559834	127,15008	91,383146	102,0310213	21,83758

p-Wert 0,857589909

8.4.5 Expression/Aktivität von AKT

Expression

Caki-1 (% der Kontrolle)

	03.02.2016	03.02.2016	26.02.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	100	100	100	100	0
Fibronectin 10 µg/ml	117,2566354	125,63161	78,677644	107,18863	25,04380699
P1D6 10 µg/ml	105,7499533	158,20987	57,512756	107,157527	50,36331284

p-Wert

0,99804525

CCF-RC1 (% der Kontrolle)

	03.02.2016	03.02.2016	26.02.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	100	100	100	100	0
Fibronectin 10 µg/ml	94,654003	96,2942417	118,993763	103,3140025	13,60381407
P1D6 10 µg/ml	83,204338	109,224472	113,852224	102,0936779	16,52148256

p-Wert

0,88270466

Aktivität

pAKT S473

Caki-1 (% der Kontrolle)

	03.02.2016	03.02.2016	26.02.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	100	100	100	100	0
Fibronectin 10 µg/ml	137,5617717	268,19292	119,37358	175,042757	81,18138337
P1D6 10 µg/ml	71,83602014	115,23578	60,096523	82,38944	29,04505672

p-Wert

0,02261164

CCF-RC1 (% der Kontrolle)

	03.02.2016	03.02.2016	26.02.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	100	100	100	100	0
Fibronectin 10 µg/ml	116,565	137,070302	98,285262	117,3068547	19,40315935
P1D6 10 µg/ml	116,46236	127,76361	87,5038647	110,576611	20,76519421

p-Wert

0,181555243

pAKT T308

Caki-1 (% der Kontrolle)

	03.02.2016	03.02.2016	26.02.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	nicht verwertbar	100	100	100	0
Fibronectin 10 µg/ml	nicht verwertbar	45,643793	2022,1447	1033,89425	1397,597196
P1D6 10 µg/ml	nicht verwertbar	52,151752	386,92927	219,540509	236,72345

p-Wert 0,22787742

03.02. nicht verwertbar, da keine Bande im Blot sichtbar

CCF-RC1 (% der Kontrolle)

	03.02.2016	03.02.2016	26.02.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	100	100	100	100	0
Fibronectin 10 µg/ml	146,81602	7,79899716	29,0114183	61,2088131	74,89284078
P1D6 10 µg/ml	88,761976	18,7081631	183,313802	96,92798028	82,60609398

p-Wert 0,625551153

8.4.6 Expression/Aktivität von ERK

Expression

Caki-1 (% der Kontrolle)

	07.01.2016	20.01.2016	02.03.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	100	100	100	100	0
Fibronectin 10 µg/ml	79,351474	118,4729866	105,5450614	101,12317	19,93208
P1D6 10 µg/ml	95,724394	127,1315539	117,2307171	113,36222	16,05697

p-Wert 0,0320127

CCF-RC1 (% der Kontrolle)

	07.01.2016	20.01.2016	02.03.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	100	100	100	100	0
Fibronectin 10 µg/ml	94,443665	118,04439	86,9792195	99,8224266	16,21603
P1D6 10 µg/ml	78,732886	110,29319	78,3564319	89,1275012	18,33099

p-Wert 0,05130533

Aktivität

Caki-1 (% der Kontrolle)

	07.01.2016	20.01.2016	02.03.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	100	100	100	100	0
Fibronectin 10 µg/ml	121,24606	178,4146854	136,5010922	145,38728	29,60213
P1D6 10 µg/ml	128,6236	168,7506918	131,2108375	142,86171	22,4578

p-Wert

0,670086

CCF-RC1 (% der Kontrolle)

	07.01.2016	20.01.2016	02.03.2016	Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	100	100	100	100	0
Fibronectin 10 µg/ml	100,23359	95,884313	75,9961129	90,7046723	12,92228
P1D6 10 µg/ml	46,548595	104,72818	32,2032565	61,1600103	38,40685

p-Wert

0,26732059

8.5 Zellvitalität**8.5.1 Proliferation**

Kontrolle

Caki-1	Zeit t	0	36,33333	76,33333	116,3333	153	188,3333	223,6667	260,3333	297	333,3333	367
	22.01.2016	1	1,214905	1,241497	1,28299	1,325917	1,366535	1,432351	1,513945	1,595776	1,589113	1,629463
	29.01.2016	1	1,088761	0,994726	1,111288	1,16773	1,195225	1,207885	1,217922	1,226202	1,27238	1,274944
	26.02.2016	1	1,129757	1,144007	1,095287	1,074098	1,24689	1,238804	1,253968	1,216238	1,30495	1,287413
	Mittelwert	1	1,144474	1,126743	1,163188	1,189248	1,26955	1,293014	1,328612	1,346072	1,388814	1,397273
	Standardabweichung	0	0,064347	0,124288	0,104059	0,127281	0,087874	0,121656	0,161512	0,216307	0,174226	0,201179
	Mittelwert Std.-Abw.		0,138273									

RC-1	Zeit t	0	36,33333	76,33333	116,3333	153	188,3333	223,6667	260,3333	297	333,3333	367
	22.01.2016	1	1,377516	1,480075	1,567502	1,601202	1,61909	1,729337	1,790055	1,91098	1,910839	1,914322
	29.01.2016	1	1,023667	0,972161	1,114747	1,158836	1,2143	1,236889	1,281654	1,33913	1,345247	1,324045
	26.02.2016	1	1,118349	1,140045	1,134738	1,125299	1,30874	1,32071	1,397458	1,344939	1,477843	1,475337
	Mittelwert	1	1,173177	1,197427	1,272329	1,295113	1,38071	1,428979	1,489723	1,531683	1,577976	1,571234
	Standardabweichung	0	0,183186	0,258774	0,255823	0,265611	0,211775	0,263472	0,266463	0,328493	0,295793	0,306601
	Mittelwert Std.-Abw.		0,263599									

P1D6+Fibronektin

Caki-1	Zeit t	0	36,33333	76,33333	116,3333	153	188,3333	223,6667	260,3333	297	333,3333	367
	22.01.2016	0,962357	1,195901	1,233559	1,245031	1,271021	1,228418	1,331106	1,414054	1,475877	1,494515	1,574777
	29.01.2016	0,862954	0,9242	0,844382	0,918579	0,98545	1,039135	1,065009	1,062436	1,074608	1,123341	1,082803
	26.02.2016	1,175351	1,315877	1,289641	1,157724	1,128058	1,361533	1,327094	1,332707	1,258516	1,390664	1,31738
	Mittelwert	1,000221	1,145326	1,122527	1,107111	1,128176	1,209695	1,24107	1,269733	1,269667	1,336173	1,324986
	Standardabweichung	0,159603	0,200677	0,242508	0,169009	0,142786	0,162012	0,152486	0,184074	0,200867	0,191493	0,246075
	Mittelwert Std.-Abw.		0,186508									

RC-1	Zeit t	0	36,33333	76,33333	116,3333	153	188,3333	223,6667	260,3333	297	333,3333	367
	22.01.2016	0,94469	1,256468	1,34633	1,468955	1,393826	1,52809	1,554464	1,630922	1,721187	1,737041	1,786515
	29.01.2016	0,849395	0,878968	0,795735	0,924557	0,965026	1,016957	1,066556	1,083598	1,131172	1,160603	1,129692
	26.02.2016	1,155228	1,393424	1,350908	1,298466	1,31278	1,558192	1,557792	1,589089	1,515664	1,723026	1,678878
	Mittelwert	0,983104	1,176286	1,164325	1,230659	1,223877	1,367746	1,392938	1,434536	1,456008	1,540223	1,531695
	Standardabweichung	0,156494	0,266436	0,319216	0,278462	0,227805	0,304165	0,282659	0,30464	0,299497	0,328835	0,35228
	Mittelwert Std.-Abw.		0,283681									

Fibronektin

Caki-1	Zeit t	0	36,33333	76,33333	116,3333	153	188,3333	223,6667	260,3333	297	333,3333	367
	22.01.2016	0,926485	1,137057	1,174098	1,204897	1,230999	1,238581	1,303811	1,404726	1,445008	1,491262	1,500901
	29.01.2016	0,895762	0,943382	0,864964	0,965523	1,029629	1,074344	1,101511	1,107188	1,11835	1,160721	1,122654
	26.02.2016	1,149141	1,239139	1,229818	1,150846	1,133838	1,274336	1,314121	1,308212	1,313398	1,378845	1,329359
	Mittelwert	0,990463	1,106526	1,089627	1,107089	1,131489	1,195754	1,239815	1,273375	1,292252	1,34361	1,317638
	Standardabweichung	0,138276	0,150224	0,196548	0,125543	0,100705	0,106653	0,119885	0,151797	0,164353	0,168064	0,189396
	Mittelwert Std.-Abw.		0,146495									

8. Anhang

RC-1	Zeit t	0	36,33333	76,33333	116,3333	153	188,3333	223,6667	260,3333	297	333,3333	367
	22.01.2016	0,847895	1,14988	1,270304	1,392232	1,464847	1,450632	1,481843	1,576861	1,632307	1,669009	1,703229
	29.01.2016	0,822511	0,85083	0,801032	0,911055	0,964807	1,017138	1,049417	1,087372	1,119763	1,14001	1,133259
	26.02.2016	1,074988	1,249787	1,254618	1,229464	1,229612	1,353281	1,447766	1,505586	1,452461	1,621811	1,602437
	Mittelwert	0,915132	1,083499	1,108651	1,177584	1,219755	1,273683	1,326342	1,38994	1,40151	1,476943	1,479642
	Standardabweichung	0,139021	0,207596	0,266522	0,244748	0,250166	0,227445	0,240428	0,264444	0,260043	0,292746	0,30418
	Mittelwert Std.-Abw.	0,245212										

Relatives Lumineszenssignal

Caki-1	Zeit t	0	36,33333	76,33333	116,3333	153	188,3333	223,6667	260,3333	297	333,3333	367
	22.01.2016	500239,3	621636,8	641211,8	647175	660684,8	638539,3	691917,3	735034,3	767170,3	776858,3	818578,8
	29.01.2016	713515,3	764154,8	698159	759507	814798	859186,8	880579,8	878452,5	888516,5	928810	895292,3
	26.02.2016	1437593	1609473	1577383	1416033	1379748	1665315	1623193	1630058	1539313	1700945	1611310
	Mittelwert	883782,3	998421,3	972251,1	940904,8	951743,4	1054347	1065230	1081181	1065000	1135538	1108394
	Standardabweichung	491325,7	533962,1	524832,1	415288,3	378587,3	540493,1	492331,3	480719,2	415223,6	495516,2	437224

RC-1	Zeit t	0	36,33333	76,33333	116,3333	153	188,3333	223,6667	260,3333	297	333,3333	367
	22.01.2016	736342	979358	1049402	1144983	1086423	1191075	1211633	1271228	1341585	1353943	1392505
	29.01.2016	717892,5	742886,8	672540,3	781417,8	815622	859512,8	901433,3	915836,5	956045	980920	954794,3
	26.02.2016	421200	508046,8	492545,5	473425	478643,8	568122	567976	579387	552616	628220,8	612124,3
	Mittelwert	625144,8	743430,5	738162,6	799941,8	793562,8	872903,3	893680,6	922150,3	950082	987694,4	986474,5
	Standardabweichung	176862,1	235656,1	284169	336161,8	304489,3	311692,3	321898,3	345963,5	394518,3	362908,3	391153,8

8.5.2 Zytotoxizität

Kontrolle

Caki-1	Zeit t	0	36,33333	76,33333	116,3333	153	188,3333	223,6667	260,3333	297	333,3333	367
	22.01.2016	1	1,020408	0,944228	0,915812	0,912012	0,935772	0,919121	0,913694	0,907272	0,912363	0,911071
	29.01.2016	1	1,000069	0,936156	0,943435	0,947446	0,952984	0,958194	0,953778	0,948479	0,956673	0,956724
	26.02.2016	1	0,972388	0,967866	0,967373	0,967892	0,967653	0,95866	0,958823	0,96396	0,947546	0,948035
	Mittelwert	1	0,997622	0,949416	0,942206	0,94245	0,952136	0,945325	0,942099	0,939903	0,938861	0,93861
	Standardabweichung	0	0,024103	0,016479	0,025802	0,028273	0,015957	0,022694	0,024728	0,029301	0,023397	0,024242

RC-1	Zeit t	0	36,33333	76,33333	116,3333	153	188,3333	223,6667	260,3333	297	333,3333	367
	22.01.2016	1	0,960516	0,915474	0,925787	0,895602	0,886152	0,902673	0,881183	0,873213	0,871131	0,867621
	29.01.2016	1	0,949607	0,836693	0,787331	0,786901	0,773111	0,775644	0,781396	0,762148	0,783457	0,764776
	26.02.2016	1	1,010911	0,991327	0,995939	0,973119	0,971601	0,945374	0,943517	0,943376	0,914413	0,9179
	Mittelwert	1	0,973678	0,914498	0,903019	0,885207	0,876955	0,874564	0,868699	0,859579	0,856334	0,850099
	Standardabweichung	0	0,032703	0,077322	0,106152	0,093543	0,099564	0,088288	0,081778	0,09138	0,06672	0,078051
	Mittelwert St.AW	0,08155										

P1D6+Fibronektin

Caki-1	Zeit t	0	36,33333	76,33333	116,3333	153	188,3333	223,6667	260,3333	297	333,3333	367
	22.01.2016	1,00373	0,96916	0,957734	0,937355	0,92424	0,939623	0,933579	0,928802	0,931044	0,925013	0,92378
	29.01.2016	1,174063	1,130945	1,104332	1,077085	1,067395	1,031597	1,088103	1,028975	1,042287	1,065574	1,076546
	26.02.2016	0,992802	0,989906	0,99921	0,991202	1,000486	0,984342	0,999595	0,986943	0,998104	1,010089	1,008136
	Mittelwert	1,056865	1,030004	1,020425	1,001881	0,997373	0,985187	1,007092	0,981574	0,990478	1,000226	1,002821
	Standardabweichung	0,101643	0,088031	0,075567	0,070474	0,071628	0,045993	0,077534	0,050302	0,056012	0,070798	0,076522
	Mittelwert St.AW	0,071319										

8. Anhang

RC-1	Zeit t	0	36,33333	76,33333	116,3333	153	188,3333	223,6667	260,3333	297	333,3333	367
	22.01.2016	1,0439	1,034956	1,021882	0,928364	0,918276	0,921309	0,881503	0,873408	0,861447	0,907153	0,864629
	29.01.2016	0,951222	0,968317	0,822374	0,812991	0,797405	0,783033	0,783828	0,795371	0,784	0,787461	0,771975
	26.02.2016	0,938942	0,908221	0,971232	0,922682	0,941818	0,957346	0,923145	0,933724	0,928891	0,909219	0,907392
	Mittelwert	0,978021	0,970498	0,938496	0,888012	0,885833	0,887229	0,862825	0,867501	0,858113	0,867944	0,847999
	Standardabweichung	0,057382	0,063396	0,103704	0,065033	0,07748	0,092018	0,071512	0,069366	0,072503	0,069708	0,069223
	Mittelwert St.AW	0,073757										

Fibronektin

Caki-1	Zeit t	0	36,33333	76,33333	116,3333	153	188,3333	223,6667	260,3333	297	333,3333	367
	22.01.2016	1,02336	1,026703	1,021984	0,954821	0,952709	0,962257	0,957145	0,939667	0,940318	0,94298	0,92985
	29.01.2016	1,080139	1,06107	1,029592	1,023812	1,012182	1,028403	1,02309	1,015372	1,06006	1,024446	1,025925
	26.02.2016	0,985202	0,971386	0,969696	0,968027	0,975904	0,974276	0,965425	0,963777	0,974433	0,957865	0,963169
	Mittelwert	1,029567	1,01972	1,00709	0,98222	0,980265	0,988312	0,981886	0,972939	0,991604	0,975097	0,972981
	Standardabweichung	0,047772	0,045248	0,032608	0,03662	0,029975	0,035236	0,035923	0,038675	0,06169	0,043381	0,048783
	Mittelwert St.AW	0,041446										

RC-1	Zeit t	0	36,33333	76,33333	116,3333	153	188,3333	223,6667	260,3333	297	333,3333	367
	22.01.2016	1,625905	1,533112	1,230762	1,078532	1,051841	1,047592	1,03839	1,044929	1,015628	1,026297	0,98492
	29.01.2016	1,064415	0,98538	0,827469	0,795911	0,792057	0,788741	0,799913	0,788278	0,796414	0,787621	0,762583
	26.02.2016	0,987134	0,93804	0,972165	0,962067	0,9835	0,977153	0,948903	0,939267	0,940305	0,919408	0,923326
	Mittelwert	1,225818	1,152177	1,010132	0,945503	0,942466	0,937829	0,929069	0,924158	0,917449	0,911109	0,890276
	Standardabweichung	0,348633	0,330747	0,20431	0,142037	0,134665	0,133831	0,120469	0,128991	0,11138	0,119554	0,114794
	Mittelwert St.AW	0,171765										

9. Danksagung

Aus Datenschutzgründen entfernt

10. Tabellarischer Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen entfernt

Aus Datenschutzgründen entfernt

Aus Datenschutzgründen entfernt