

„Präklinische Analysen zur Integration von Naturstoffen in die
Behandlung therapieresistenter Nierenzellkarzinome“

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Sascha Dennis Markowitsch

geb. am 29.09.1984 in Dortmund

Mainz, 2022

Dekan: Prof. Dr. Eckhard Thines

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 14.07.2022

D77

Danksagung

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Nierenzellkarzinom (NZK)	1
1.2 Molekulare Tumorbiologie des NZK	3
1.3 Klassifizierung und Therapieoptionen.....	5
1.3.1 Zielgerichtete Therapieansätze.....	6
1.4 Resistenzproblematik in der Behandlung des fortgeschrittenen NZK	11
1.5 Naturstoffe und komplementäre alternative Medizin	12
1.5.1 Artemisinin – Artesunat (ART)	13
1.5.2 Shikonin (SHI)	17
1.6 Ziel der Studie	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Chemikalien	20
2.2 Material	23
2.3 Verbrauchsmaterial	23
2.4 Kits.....	26
2.5 Geräte.....	26
2.6 Software.....	29
2.7 Antikörper Western-Blot	30
2.7.1 Zellzyklusregulierende Proteine.....	30
2.7.2 Zelltodproteine.....	30
2.7.3 Standardproteine / Ladungskontrolle	30
2.7.4 Sekundäre Antikörper	31
2.8 Antikörper Durchflusszytometrie.....	31
2.8.1 Adhäsionsrezeptoren – Integrine	31
2.8.2 Isotypenkontrolle	32
2.9 Blockadestudien.....	32
2.9.1 Funktionsblockierende Antikörper.....	32
2.10 Zellkultivierung	33
2.10.1 Verwendete Zellkulturen.....	33
2.10.2 Verwendete Kulturmedien.....	36
2.10.3 Steriles Arbeiten unter einer Sicherheitswerkbank.....	36
2.10.4 Isolation von vaskulären Endothelzellen aus der Umbilikalvene (HUVEC).....	37
2.10.5 Passagieren und Kultivieren der Zellkulturen.....	37

Inhaltsverzeichnis

2.10.6	Bestimmung und Einstellung auf eine definierte Zellzahl	38
2.10.7	Einfrieren und Lagerung der Zellkulturen	38
2.10.8	Auftauen von kryokonservierten Zellen	38
2.11	Analysen zur Bestimmung des Zellwachstums	39
2.11.1	Bestimmung des Tumorzellwachstums – Viabilität (MTT-Test)	39
2.11.2	Bestimmung der Zellproliferation (BrdU-Test)	40
2.11.3	Bestimmung des klonogenen Potenzials – klonogenes Wachstum	41
2.11.4	Resistenznachweis (Sunitinib)	42
2.12	Zellzyklusanalysen mittels Durchflusszytometrie	43
2.13	Quantifizierung von apoptotischen und nekrotischen Zellen mit der Durchflusszytometrie	44
2.14	Nachweis nekroptotischer Ereignisse nach SHI-Behandlung	45
2.15	Bestimmung ferroptotischer Ereignisse nach ART-Behandlung	46
2.15.1	Quantifizierung reaktiven Sauerstoffs mit dem GSH-Test	47
2.16	Quantifizierung der Proteinexpression mittels Western-Blot-Analyse	48
2.16.1	Proteinextraktion aus Zellkulturen und Bestimmung des Proteingehalts	48
2.16.2	Probenvorbereitung für die SDS-Gelelektrophorese	50
2.16.3	SDS-Gelelektrophorese	50
2.16.4	Proteintransfer auf eine Trägermembran - Blotvorgang	52
2.17	Bestimmung der Adhäsion von NZK-Zellen an extrazelluläre Matrixproteine (EZM-Proteine)	55
2.18	Messung des Adhäsionsverhaltens von NZK-Zellen an HUVEC	56
2.19	Analyse der Chemotaxis und Migration der NZK-Zellen	56
2.20	Migration von NZK-Zellen im Wundheilungstest	57
2.21	Detektion der Oberflächenexpression von Adhäsionsproteinen (Integrinen)	58
2.22	Blockade von Integrinsubtypen mit funktionsinhibierenden Antikörpern	59
2.22.1	Adhäsion von NZK-Zellen nach Integrin-Blockade	59
2.22.2	Migration und Chemotaxis von NZK-Zellen nach Integrin-Blockade	59
2.23	Datenauswertung und Statistik	60
3	Ergebnisse	61
3.1	Resistenznachweis chronisch mit Sunitinib behandelter NZK-Zellen	61
3.2	Studien zum Wachstumsverhalten der NZK-Zellen nach Behandlung mit ART oder SHI	63
3.2.1	Bestimmung der Zellviabilität als Indikator für das Zellwachstum	63
3.2.2	Bestimmung der Proliferation	72
3.2.3	Bestimmung des klonogenen Wachstums	82
3.3	Zellzyklusanalysen	88
3.3.1	Der Einfluss von ART und SHI auf die Zellzyklusphasen von NZK-Zellen	88
3.3.2	Molekulare Modulationen zellzyklusregulierender Proteine nach ART- oder SHI-Behandlung	92
3.4	Induktion verschiedener Zelltodereignisse nach Behandlung mit ART oder SHI	100
3.4.1	Apoptose-Induktion nach ART- oder SHI-Behandlung	100

Inhaltsverzeichnis

3.4.2	Ferroptose-Induktion nach ART-Behandlung.....	102
3.4.3	Nekroptose-Induktion nach SHI-Behandlung.....	112
3.5	Veränderungen des Metastasierungsverhaltens.....	120
3.5.1	Adhäsion der NZK-Zellen an EZM-Proteine und HUVEC nach ART- oder SHI-Gabe	120
3.5.2	Der Einfluss von ART und SHI auf die Migration und Chemotaxis der NZK-Zellen	124
3.5.3	Modulation der Integrin-Expressionsprofile unter ART oder SHI	131
3.5.4	Integrin-Blockadestudien	140
4	Diskussion.....	145
4.1	Sunitinib-Resistenz.....	145
4.2	ART zeigt eine antitumorale Wirkung in parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen	147
4.2.1	ART reduziert das Wachstum von parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen	147
4.2.2	ART reduziert die Proliferation von parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen	149
4.2.3	ART hemmt das klonogene Wachstum von parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen	150
4.2.4	Die Behandlung mit ART führt zu einem G0/G1-Zellzyklusarrest.....	151
4.2.5	ART induziert apoptotische Effekte.....	152
4.2.6	ART induziert zelltypspezifisch die Ferroptose.....	153
4.2.7	ART beeinflusst die Adhäsion und Migration von parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen	157
4.2.8	ART verändert das Integrin-Expressionsmuster von parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen	158
4.2.9	Die durch ART regulierten Integrine führen zu einer veränderten Adhäsion und Migration (Blockadestudien).....	162
4.3	SHI zeigt eine antitumorale Wirkung in parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen	164
4.3.1	SHI reduziert das Wachstum von parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen	164
4.3.2	SHI reduziert die Proliferation von parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen	165
4.3.3	SHI hemmt das klonogene Wachstum von parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen	166
4.3.4	Die Behandlung mit SHI führt zelltypspezifisch zu einem G2/M-Zellzyklusarrest.....	167
4.3.5	SHI induziert apoptotische Effekte.....	168
4.3.6	SHI induziert die Nekroptose	169
4.3.7	SHI beeinflusst das Integrin-Expressionsmuster, jedoch nicht die Adhäsion und Migration von parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen	170
5	Fazit.....	171
6	Ausblick	171

Inhaltsverzeichnis

7	Zusammenfassung.....	173
8	Summary.....	175
9	Literaturverzeichnis	176
10	Lebenslauf	198
11	Publikationen und Veröffentlichungen	199
12	Erklärung	204

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Metastasierung von Tumorzellen	2
Abbildung 2: Molekulare Antwort auf Hypoxie mit intaktem und mutiertem VHL-Status.....	3
Abbildung 3: Übersicht der zielgerichteten Therapieansätzen beim NZK.....	7
Abbildung 4: Strukturformel von Artemisinin und Artesunat	13
Abbildung 5: Der Ferroptose Signalweg	15
Abbildung 6: Strukturformel von Shikonin.....	17
Abbildung 7: Der Nekroptose-Signalweg.....	18
Abbildung 8: Mikroskopische Aufnahmen der verwendeten NZK-Zelllinien	35
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Western-Blot-„Sandwich“-Aufbaus.	53
Abbildung 10: Dosis-Wirkungskurven der NZK-Zellen nach Behandlung mit Sunitinib.	62
Abbildung 11: Dosis-Wirkungskurven der NZK-Zellen nach Behandlung mit ART.....	65
Abbildung 12: Dosis-Wirkungskurven der NZK-Zellen nach Behandlung mit SHI.....	69
Abbildung 13: Zellproliferation (BrdU) der Caki-1 Zellen nach ART-Behandlung.	73
Abbildung 14: Zellproliferation (BrdU) der 786-O Zellen nach ART-Behandlung.....	74
Abbildung 15: Zellproliferation (BrdU) der KTCTL-26 Zellen nach ART-Behandlung.	75
Abbildung 16: Zellproliferation (BrdU) der A-498 Zellen nach ART-Behandlung.	76
Abbildung 17: Zellproliferation (BrdU) der Caki-1 Zellen nach SHI-Behandlung.	78
Abbildung 18: Zellproliferation (BrdU) der 786-O Zellen nach SHI-Behandlung.....	79
Abbildung 19: Zellproliferation (BrdU) der KTCTL-26 Zellen nach SHI-Behandlung.	80
Abbildung 20: Zellproliferation (BrdU) der A-498 Zellen nach SHI-Behandlung.	81
Abbildung 21: Klonogenes Wachstum der Caki-1 Zellen nach ART-Behandlung.	82
Abbildung 22: Klonogenes Wachstum der 786-O Zellen nach ART-Behandlung.....	83
Abbildung 23: Klonogenes Wachstum der KTCTL-26 Zellen nach ART-Behandlung.	84
Abbildung 24: Klonogenes Wachstum der A-498 Zellen nach ART-Behandlung.	84
Abbildung 25: Klonogenes Wachstum der Caki-1 Zellen nach SHI-Behandlung.....	85
Abbildung 26: Klonogenes Wachstum der 786-O Zellen nach SHI-Behandlung.	86
Abbildung 27: Klonogenes Wachstum der KTCTL-26 Zellen nach SHI-Behandlung.	86
Abbildung 28: Klonogenes Wachstum der A-498 Zellen nach SHI-Behandlung.	87
Abbildung 29: Veränderung der Zellzyklusphase der NZK-Zellen nach ART-Behandlung. ...	88
Abbildung 30: Veränderung der Zellzyklusphase der NZK-Zellen nach SHI-Behandlung.	90
Abbildung 31: Zellzyklusregulierende Proteine nach ART-Behandlung in Caki-1 Zellen.....	92
Abbildung 32: Zellzyklusregulierende Proteine nach ART-Behandlung in Caki-1 Zellen.....	93
Abbildung 33: Zellzyklusregulierende Proteine nach ART-Behandlung in 786-O Zellen.	94
Abbildung 34: Zellzyklusregulierende Proteine nach ART-Behandlung in 786-O Zellen.	95
Abbildung 35: Zellzyklusregulierende Proteine nach SHI-Behandlung in Caki-1 Zellen.....	96
Abbildung 36: Zellzyklusregulierende Proteine nach SHI-Behandlung in Caki-1 Zellen.....	97

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 37: Zellzyklusregulierende Proteine nach SHI-Behandlung in 786-O Zellen	98
Abbildung 38: Zellzyklusregulierende Proteine nach SHI-Behandlung in 786-O Zellen.	99
Abbildung 39: Apoptose - Annexin V-positive NZK-Zellen nach einer Behandlung mit ART.....	101
Abbildung 40: Apoptose - Annexin V-positive NZK-Zellen nach einer Behandlung mit SHI.	102
Abbildung 41: Ferroptose-Nachweis in Caki-1 Zellen nach ART-Behandlung.	103
Abbildung 42: Ferroptose-Nachweis in 786-O Zellen nach ART-Behandlung.....	104
Abbildung 43: Ferroptose-Nachweis in KTCTL-26 Zellen nach ART-Behandlung.	106
Abbildung 44: Ferroptose-Nachweis in A-498 Zellen nach ART-Behandlung.	107
Abbildung 45: Der Einfluss von Eisen auf die ferroptotischen Ereignisse der KTCTL-26 Zellen.....	108
Abbildung 46: Beteiligung von ROS im Wirkmechanismus von ART in KTCTL-26 Zellen.....	109
Abbildung 47: GSH-Gehalt der KTCTL-26 Zellen nach Behandlung mit ART.....	109
Abbildung 48: GPX4-Expression in den KTCTL-26 Zellen nach ART-Behandlung.	110
Abbildung 49: Mikroskopische Aufnahmen mit ART behandelter KTCTL-26 Zellen.....	111
Abbildung 50: Nekroptose-Nachweis in Caki-1 Zellen nach SHI-Behandlung.....	113
Abbildung 51: Nekroptose-Nachweis in 786-O Zellen nach SHI-Behandlung.	114
Abbildung 52: Nekroptose-Nachweis in KTCTL-26 Zellen nach SHI-Behandlung.....	116
Abbildung 53: Nekroptose-Nachweis in A-498 Zellen nach SHI-Behandlung.	117
Abbildung 54: RIP1-Expression in 786-O Zellen nach SHI-Behandlung.	118
Abbildung 55: Expression relevanter Apoptoseproteine in 786-O Zellen nach SHI-Behandlung.	119
Abbildung 56: Adhäsion der ART-behandelten Caki-1 Zellen.....	120
Abbildung 57: Adhäsion der ART-behandelten 786-O Zellen	121
Abbildung 58: Adhäsion der SHI-behandelten Caki-1 Zellen	122
Abbildung 59: Adhäsion der SHI-behandelten 786-O Zellen.....	123
Abbildung 60: Basale Migration und Chemotaxis der NZK-Zellen.....	124
Abbildung 61: Migration und Chemotaxis der Caki-1 Zellen nach Behandlung mit ART.	125
Abbildung 62: Migration und Chemotaxis der 786-O Zellen nach Behandlung mit ART.....	126
Abbildung 63: Migration der Caki-1 Zellen im Wundheilungstest nach ART-Behandlung. ...	127
Abbildung 64: Migration der 786-O Zellen im Wundheilungstest nach ART-Behandlung....	128
Abbildung 65: Migration und Chemotaxis von Caki-1 Zellen nach Behandlung mit SHI.....	129
Abbildung 66: Migration und Chemotaxis von 786-O Zellen nach Behandlung mit SHI.	130
Abbildung 67: Basales Integrin-Expressionsprofil der Zelllinie Caki-1.....	131
Abbildung 68: Basales Integrin-Expressionsprofil der Zelllinie 786-O.....	132
Abbildung 69: Basales Integrin-Expressionsprofil der Zelllinie KTCTL-26.....	133
Abbildung 70: Basales Integrin-Expressionsprofil der Zelllinie A-498.	134
Abbildung 71: Integrin-Expressionsmuster der Zelllinie Caki-1 nach ART-Behandlung.	135

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 72: Integrin-Expressionsmuster der Zelllinie 786-O nach ART-Behandlung.....	136
Abbildung 73: Integrin-Expressionsmuster der Zelllinie KTCTL-26 nach ART-Behandlung.	137
Abbildung 74: Integrin-Expressionsmuster der Zelllinie A-498 nach ART-Behandlung.	137
Abbildung 75: Integrin-Expressionsmuster der Zelllinie Caki-1 nach SHI-Behandlung.....	138
Abbildung 76: Integrin-Expressionsmuster der Zelllinie 786-O nach SHI-Behandlung.....	139
Abbildung 77: Integrin-Expressionsmuster der Zelllinie KTCTL-26 nach SHI-Behandlung.	139
Abbildung 78: Integrin-Expressionsmuster der Zelllinie A-498 nach SHI-Behandlung.	140
Abbildung 79: Adhäsion der parentalen Caki-1 Zellen nach Integrin-Blockade.....	141
Abbildung 80: Adhäsion der Sunitinib-resistenten 786-O Zellen nach Integrin-Blockade. ...	142
Abbildung 81: Migration und Chemotaxis der Caki-1 Zellen nach Integrin-Blockade.	143
Abbildung 82: Migration und Chemotaxis der 786-O Zellen nach Integrin-Blockade.....	144

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Stadien des Nierenzellkarzinoms	5
Tabelle 2:	Chemikalien.....	20
Tabelle 3:	Material.....	23
Tabelle 4:	Verbrauchsmaterial.....	23
Tabelle 5:	Kits	26
Tabelle 6:	Geräte	26
Tabelle 7:	Software	29
Tabelle 8:	Antikörper Zellzyklusregulierende Proteine	30
Tabelle 9:	Antikörper Zelltodproteine.....	30
Tabelle 10:	Antikörper Standardproteine / Ladungskontrolle	30
Tabelle 11:	Sekundäre Antikörper	31
Tabelle 12:	Antikörper Adhäsionsrezeptoren – Integrine	31
Tabelle 13:	Isotypenkontrolle	32
Tabelle 14:	Funktionsblockierende Antikörper.....	32
Tabelle 15:	Zellcharakterisierung	34
Tabelle 16:	Zellzahlen und verwendete Konzentrationen von ART und SHI für die Bestimmung der Zellviabilität (MTT-Test)	39
Tabelle 17:	Zellzahlen und verwendete Konzentrationen von ART und SHI für die Bestimmung der Zellproliferation (BrdU)	40
Tabelle 18:	Zellzahlen und Konzentrationen von ART und SHI für die Behandlung des klonogenes Wachstums.....	41
Tabelle 19:	Färbung Apoptose / Durchflusszytometrie	44
Tabelle 20:	Behandlungen für den Nekroptose-Nachweis	45
Tabelle 21:	Behandlungen zur Bestimmung der Ferroptose mittels BrdU.....	46
Tabelle 22:	Rezepturen SDS-Gele	51
Tabelle 23:	IC ₅₀ -Werte der NZK-Zellen nach einer Sunitinib-Behandlung.....	61
Tabelle 24:	IC ₅₀ -Werte der parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen nach ART-Behandlung	63
Tabelle 25:	IC ₅₀ -Werte der parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen nach SHI-Behandlung	68

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
µM	Mikromol
ABCB1	ATP-Bindungskassette, Unterfamilie B
AKT	Proteinkinase B
ANOVA	<i>Analysis of the variance</i>
ART	Artesunat
ATP	Adenosintriphosphat
AXL	Tyrosin-Protein-Kinase-Rezeptor UFO
BMI	<i>Body Mass Index</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CAM	<i>Complementary and Alternative Medicine</i>
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
cm	Zentimeter
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DMT1	<i>Divalent Metal Transporter 1</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (bzw. -acid)
ECGS	<i>Endothelial Cell Growth Supplement</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMT	<i>Epithelial-to-mesenchymal Transition</i>
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinases</i>
EU	Europäische Union
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated Protein with Death Domain</i>
FCS	Fetales Kälberserum
Fe	Eisen, holo-Transferrin
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
FLT-3	<i>FMS-like Tyrosine Kinase 3</i>
g	Gramm
GPX4	<i>Phospholipid-Hydroxyperoxid-Glutathion-Peroxidase</i>
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF	Hypoxie-induzierbarer Transkriptionsfaktor
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IC	Inhibitorische Konzentration
ICI	Immuncheckpoint-Inhibitor
IFNα	Interferon-alpha
IgG	Immunglobulin G

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
ISCOVE	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
kg	Kilogramm
KIT	Stammzellfaktorrezeptor
l	Liter
LOH	<i>Loss of Heterozygosity</i>
M	Mol
M199	Medium 199
MAPK	Ras/Raf/Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation - 7</i>
MEK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase Kinase</i>
MET	<i>Tyrosine-protein Kinase Met</i>
mg	Milligramm
min	Minute
miR-15b	micro-Ribonukleinsäuren 15B
miRNA	micro-Ribonukleinsäure
ml	Milliliter
MLKL	<i>Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein</i>
mM	Millimol
mNZK	Metastasiertes Nierenzellkarzinom
MPF	<i>Mitosis-promoting Factor</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
N	Normalität
n	Anzahl
NFκB	<i>Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of Activated B-cells</i>
nM	Nanomol
nm	Nanometer
ns	Nicht signifikant
NZK	Nierenzellkarzinom
OD	Optische Dichte
OS	<i>Overall survival</i>
p21	<i>Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1</i>
p27	<i>Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1B</i>
p53	<i>Tumor Protein p53</i>
parental	Therapiesensitive Zellen
PBS ⁻	Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Mg ²⁺ , Ca ²⁺
PBS ⁺	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Mg ²⁺ , Ca ²⁺
PD-1	<i>Programmed Cell Death Protein 1</i>
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>
PDGFR	<i>Platelet-derived Growth Factor Receptor</i>
PD-L1	<i>Programmed Cell Death 1 Ligand 1</i>
PFS	<i>Progression-free Survival</i>
PHGPx	<i>Phospholipid-Hydroxyperoxid-Glutathion-Peroxidase</i>

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
PI	Propidium-Iodid
PI3K	<i>Phosphoinositid-3-Kinase</i>
PKM2	Pyruvatkinase M2
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
pVHL	<i>Von Hippel–Lindau Tumor Suppressor</i>
Raf	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat Sarcoma</i>
rcf	<i>Relative Centrifugal Force</i>
resistent	Sunitinib-resistente Zellen
Ret	Rezeptor-Tyrosinkinase
RIP	Rezeptor-interagierende Serine/Threonine-Proteinkinase
RNA	Ribonukleinsäure (bzw. - <i>acid</i>)
RNase A	Ribonuklease A
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>Revolutions per Minute</i>
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SHI	Shikonin
siRNA	<i>Small Interfering Ribonucleic Acid</i>
SLC3A2	<i>4F2 Cell-surface Antigen Heavy Chain</i>
SLC7A11	<i>Cystine/Glutamate Transporter</i>
T25	25 cm ² Zellkulturflasche
T75	75 cm ² Zellkulturflasche
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin
TFR1	Transferrin-Rezeptor 1
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ1
TNM	Tumor, Nodus, Metastasen
TRADD	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1-associated DEATH Domain Protein</i>
TRKB	<i>Tropomyosin Receptor Kinase B</i>
Trolox	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure
U	<i>Unit</i>
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
UMRC-2	<i>University of Michigan-Renal Carcinoma-2</i>
V	Volt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
VHL	Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor
VHL-Syndrom	Von-Hippel-Lindau-Syndrom
wt	Wildtyp
xCT	<i>Cystine/Glutamate Transporter</i>

1 Einleitung

Die paarig angelegten Nieren sind zur Filterung des Blutes, Absorption von Produkten des Stoffwechsels durch Produktion von Harn und Aufrechterhaltung der Homöostase essenziell. Für Störungen dieses Systems können verschiedene Faktoren, u. a. Fehlbildungen, Autoimmun-, tubulo-interstitielle, systemische oder erbliche Erkrankungen sowie Tumore verantwortlich sein. Das Nierenzellkarzinom (NZK) ist dabei mit 90 % der häufigste Tumor der Niere und zählt zu den aggressivsten urologischen Tumorerkrankungen (1, 2). Es macht dabei 3 % aller malignen Erkrankungen aus (1, 3). Erschwerend bei der Detektion des NZK ist, dass die Erkrankung im Anfangsstadium meist asymptomatisch verläuft und daher häufig als Zufallsbefund diagnostiziert wird. 50 – 56 % der Tumore werden dennoch in einem frühen Stadium erkannt (4, 5). Maßgeblich verantwortlich hierfür sind verbesserte diagnostische Verfahren. Dabei werden mehr als 50 % der Tumore mit bildgebenden, nicht invasiven Methoden, wie der Sonografie, der Computertomografie und der Magnetresonanztomografie diagnostiziert (6-8). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt im frühen Stadium bei bis zu 90 % (9). Die Wahrscheinlichkeit Metastasen zu entwickeln steigt dabei proportional zur Tumorgroße (10). 20 – 30 % der Patienten zeigen bereits bei Erstdiagnose Fernmetastasen (11). Im metastasierten Zustand sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate auf 12 % (12). In Deutschland registrierte das Robert Koch-Institut (RKI) für 2016 14.640 Neuerkrankungen, für das Jahr 2020 wurden 15.400 Neuerkrankungen prognostiziert (4, 13). Das mittlere Ersterkrankungsalter liegt bei Frauen bei 72 Jahren und bei Männern bei 68 Jahren (4). Das mittlere Sterbealter im Jahr 2016 zeigt mit 77 Jahren bei Frauen und 74 Jahren bei Männern im Bezug zum Erkrankungsalter den aggressiv progressiven Charakter des Nierentumors (4).

1.1 Das Nierenzellkarzinom (NZK)

Das NZK kann histologisch in vier Hauptgruppen unterteilt werden, das klarzellige (75 – 85 %), das papilläre (10 %), das chromophobe NZK (5 %) und das vergleichsweise seltene Ductus-Bellini-Karzinom (1 %) (14, 15). Zu den Hauptrisikofaktoren zählen der Konsum von Tabakwaren (16), Adipositas bei einem *Body Mass Index* (BMI) > 30 (17), Bluthochdruck (18) und eine chronische Niereninsuffizienz (19). Außerdem können angeborene Erkrankungen (genetische Disposition), wie die tuberöse Sklerose (20) oder das Von-Hippel-Lindau-Syndrom (VHL-Syndrom) (21), zur Bildung von Tumoren führen. Neben den Hauptrisikofaktoren können auch die Einnahme von Schmerzmitteln, das Vorkommen von Nierensteinen (22), eine Hepatitis-C-Infektion (23) und die Ernährung (zu hoher Fleisch- und Salzkonsum) (24-26) zur Krankheitsentstehung beitragen. Ebenfalls wird ein geschlechts- und altersbezogener Zusammenhang beschrieben. Dabei sind es molekulare

Veränderungen, die in einer Tumorgenese resultieren. Besonders das metastasierte NZK ist aufgrund seines aggressiven Charakters mit einer schlechten Prognose assoziiert (27). Aus Tumoren, die invasiv in umliegendes Gewebe infiltrieren, können einzelne Zellen in Blut- oder Lymphgefäße migrieren (Intravasation) (28) (Abbildung 1). Adhärenzen die so frei zirkulierenden Tumorzellen erneut an Endothelzellen, ist die Extravasation in das umliegende Gewebe möglich. Eine Kolonisation der Tumorzellen im betroffenen Organ oder Gewebe führt zu Metastasen (Abbildung 1).

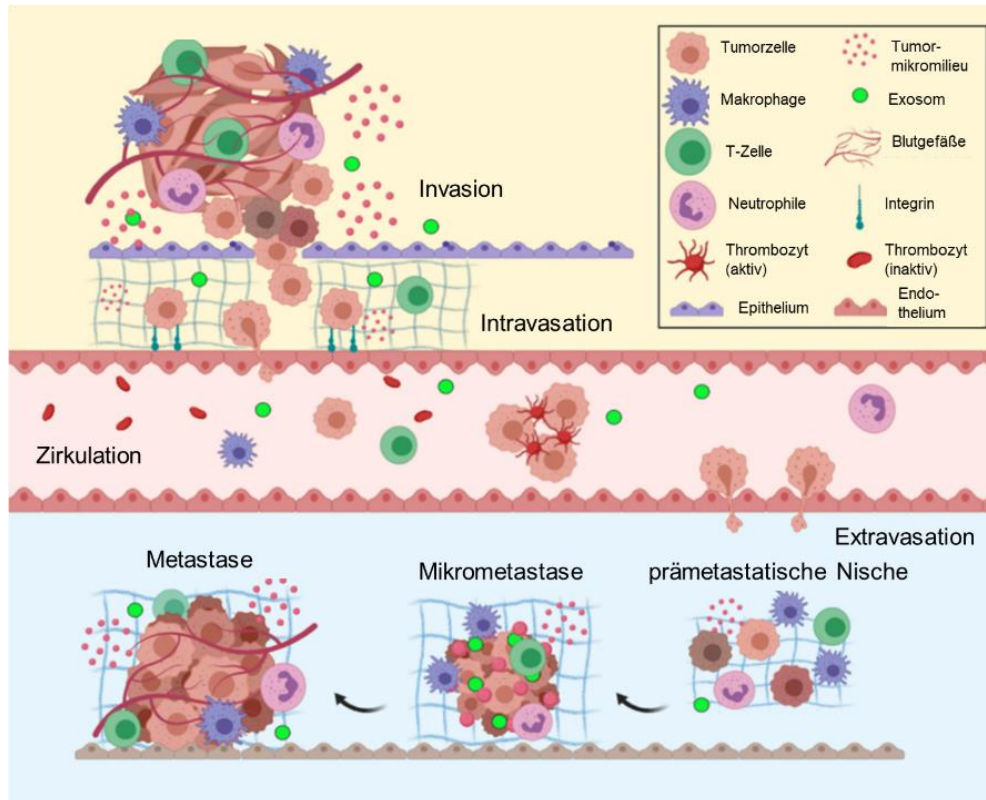


Abbildung 1: Metastasierung von Tumorzellen (abgeändert von Fares *et al.* 2020 (28))

1.2 Molekulare Tumorbilogie des NZK

Das aus dem proximalen Tubulus hervorgehende klarzellige NZK bildet mit 75 – 85 % den überwiegenden Anteil maligner Tumore der Niere. Fragmentverluste auf Chromosom 3, mit einhergehendem Defizit der Heterozygotie (LOH - *Loss of Heterozygosity*) sind häufig (93 %) (29). Eine *VHL*-Mutation ist beim klarzelligen NZK mit 45 – 82 % vermehrt vorzufinden und tritt hereditär oder sporadisch auf (30-32). Das *VHL*-Gen ist auf Chromosom 3p25-26 lokalisiert und kodiert den Tumorsuppressor VHL. Die Mutation kann zum Funktions- oder Kompletverlust des Proteins führen, was sich zunächst in der Ausprägung gutartiger Gewebeeränderungen widerspiegelt. Hauptsächlich sind diese im Kleinhirn und der Netzhaut lokalisiert (33). In der Niere jedoch sind diese Veränderungen zumeist verantwortlich für die Entwicklung eines malignen Krankheitsbildes. Die Funktion von VHL ist vielseitig, so beeinflusst es direkt oder indirekt das Zellüberleben, den Zellzyklus, die Apoptose (= programmierter Zelltod), die Seneszenz, die Adhäsion und Invasion (34, 35). VHL ist dabei als zentrales Protein im VCB-Cul2-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex an der Regulation des Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktors (HIF) beteiligt (36). HIF besteht aus einer α - und einer β -Untereinheit. Im normalen Sauerstoffmilieu (Normoxie) liegt HIF- α hydroxyliert vor. Die Hydroxylierung führt dazu, dass VHL an HIF- α bindet und durch Ubiquitinierung dessen Abbau induziert (Abbildung 2).

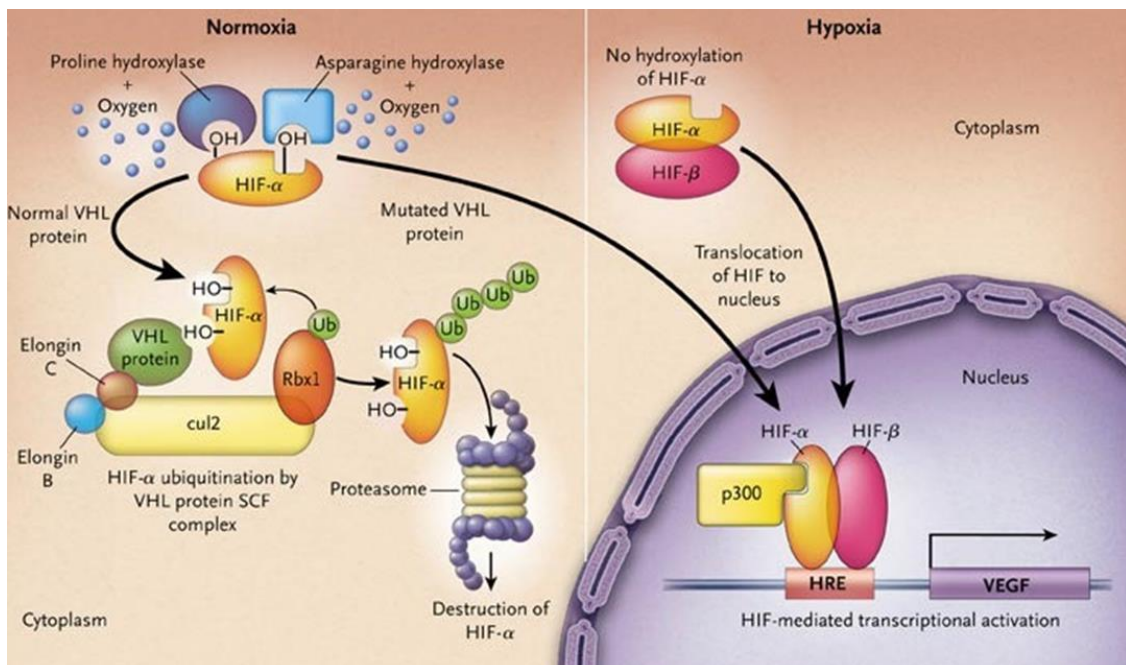


Abbildung 2: Molekulare Antwort auf Hypoxie mit intaktem und mutiertem VHL-Status (abgeändert von Cohen und McGovern 2005 (37))

Bei bestehender Hypoxie hingegen wird HIF aktiviert und transloziert als Transkriptionsfaktor in den Zellkern, wo es die Transkription seiner Zielgene aktiviert, welche maßgeblich in die Gefäßneubildung (Angiogenese) und den Metabolismus involviert sind (38). Ist das regulatorische Einwirken von VHL gestört, resultiert dies in einer konstitutiven HIF-Aktivierung. Diese führt zur Überexpression von Wachstumsfaktoren (39), wie dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor*) (40) (Abbildung 2) sowie der Aktivierung des Ras/Raf/Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)- und des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs, bestehend aus der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K), der Proteinkinase B (AKT) und dem *mechanistic Target of Rapamycin* (mTOR) (40). Die MAPK ist an vielen wachstumsfördernden Signalwegen beteiligt und stellt ein wichtiges Element in der Tumorprogression dar (41, 42). mTOR bildet als Schlüsselprotein im Signalweg mit PI3K und AKT einen Mediator für das Zellüberleben, das Zellwachstum und die Proliferation (43). Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Reaktion von Zellen auf Hypoxie und Nährstoffknappheit (44) und wirkt dabei aktivierend auf HIF- α ein (45). Der mTOR-Signalweg liegt bei vielen Tumorentitäten hochreguliert oder konstitutiv aktiviert vor (46, 47). Beim NZK wird eine signifikante Veränderung dieses Signalwegs bei klarzelligen, hochgradigen Tumoren und Tumoren mit schlechter Prognose beschrieben (48). Die Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges ist zudem relevant für die Resistenzentstehung (49). Der Transkriptionsfaktor p53, der nach Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Schädigung Gene des Zellzyklus und der Apoptose reguliert, ist in vielen Tumoren mutiert. Eine Studie belegt, dass beim NZK 36 % der Tumorproben eine p53-Mutation aufweisen (50). Weiterhin kommen Veränderungen oder Verlust der zellzyklushemmenden Proteine p21 (CDK-Inhibitor 1 - *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1*), ein Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen (51), und p27 (*Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1B*) (52), die den Zellzyklus und somit das Wachstum hemmen, häufig vor. Dies gilt auch für das proapoptotische Enzym *Phosphatase and Tensin Homolog* (PTEN) (51). Das Protein hemmt die Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs und wirkt als Tumorsuppressor (53, 54). Die PTEN-Expression ist beim fortgeschrittenen NZK häufig reduziert (55), sodass es zum Verlust dieses wichtigen Regulators kommt. Neben Veränderungen des Wachstumsverhaltens sind Veränderungen in den Adhäsions- und Migrationseigenschaften der Tumorzellen von besonderer Bedeutung. Induziert werden kann der Prozess durch Modulationen der Integrine (56). Die Transmembranproteine vermitteln Reize von außerhalb der Zelle ins Zellinnere. Aufgebaut sind die 24 bekannten Integrin-Heterodimere aus jeweils einer von 18 α - und 8 β -Untereinheiten. Integrine sind weiterhin als Differenzierungsmarker in die Signaltransduktion, das Überleben und das Wachstum der Zellen involviert (57). Integrine beeinflussen außerdem über Signale von Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM), wie Kollagen, Fibronectin oder Laminin, die Adhäsion, Invasion

und Migration von Tumorzellen (56). Weitere relevante Adhäsionsrezeptoren stellen E-Cadherin und CD44 dar (58). Der Verlust von E-Cadherin ist dabei eine Schlüsselreaktion in der Umwandlung von Zellen von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Zelltyp (EMT - *Epithelial-to-mesenchymal Transition*) (59), der mit einer höheren Metastasierung (60) und schlechteren Prognose assoziiert ist (61). Die molekularen Veränderungen resultieren in einem Tumorprogress, der unterschiedlich klassifiziert werden kann und mit der Wahl unterschiedlicher Therapieoptionen einhergeht.

1.3 Klassifizierung und Therapieoptionen

Die Therapie des NZK ist an das Erkrankungsstadium gebunden. Dabei wird nach TNM-Klassifizierung (Tumor, Nodus (Lymphknoten), Metastasen) zwischen vier Stadien unterschieden (Tabelle 1) (62).

Tabelle 1: Stadien des Nierenzellkarzinoms (nach Union for International Cancer Control (UICC) (7))

Stadium	Tumor (T)	Nodus (N)	Metastasen (M)
I	1	0	0
II	2	0	0
III	3	0	0
	1,2,3	1	0
IV	4	beliebiges N	0
	beliebiges T	beliebiges N	1

Der chirurgische Eingriff bildet derzeit die einzige kurative Option beim NZK und ist das Mittel der Wahl in den Stadien I–IV ohne Fernmetastasen (Tabelle 1). Dabei wird, sofern chirurgisch möglich, eine organerhaltende Operation angestrebt (partielle Nephrektomie). Ist dies nicht möglich, ist die Entfernung des kompletten Organs anzustreben (radikale Nephrektomie). Ausschlaggebend hierfür sind die lokale Begrenzung und die Tumorgöße. Das Stadium I umfasst Tumore, die kleiner als 7 cm und nicht metastasiert sind (T1 ≤ 7 cm, T1a ≤ 4 cm, T1b > 4 cm ≤ 7 cm) (7). Tumore mit einem Durchmesser von 7 – 10 cm ohne vorliegende Metastasen sind in Stadium II einzuordnen (T2 > 7 cm, T2a > 7 cm ≤ 10 cm, T2b > 10 cm), ab dem Vorliegen mindestens einer Lymphknotenmetastase jedoch im Stadium III. T3-Tumore, die bereits in größere Blutgefäße oder ins perinephrische Gewebe einwachsen, aber nicht in die Nebenniere und jenseits der Gerota-Faszie, sind ebenfalls unter Stadium III eingegliedert. Stadium IV zeigt einen fortgeschrittenen Krankheitsverlauf mit einem Tumorwachstum jenseits der Gerota-Faszie oder mit einer vorliegenden Fernmetastasierung. Operativ bietet sich auch in diesem Fall bei potenzieller Resektabilität das Entfernen der Niere oder von Teilbereichen an, um eine Zytoreduktion herbeizuführen.

Ebenfalls kommt die Metastasen-Chirurgie infrage, sofern die Resektabilität gegeben ist. Bei multipler Metastasierung erfolgt zusätzlich eine medikamentöse (adjuvante) Therapie (7). Das NZK ist definiert als ein Chemotherapie-resistenter Tumor (63). Daher kommen Chemotherapeutika für die Therapie des NZK nicht in Betracht. Aufgrund mangelnder Empfindlichkeit ist auch die Strahlentherapie beim NZK nicht erfolgversprechend (64). Eine Therapieoption bot lange Zeit die Zytokin-Therapie oder auch Immunchemotherapie mit Interleukin-2 (IL-2) und Interferon-alpha (IFN α), die bis zum Jahr 2000 zum Standard gehörte und heute nur noch nachrangige Anwendung findet. Eine retrospektive Studie von 1986 – 2006 zeigt, dass nur eine kleine Anzahl an Patienten profitiert und lediglich 20 % auf die Therapie ansprechen (65). Neue Forschungsansätze, basierend auf dem wachsenden Verständnis molekularer Mechanismen, führten zu einer verbesserten Prognose (66) und in den letzten zwei Dekaden zur der Entwicklung zahlreicher neuer zielgerichteter Therapien (67).

1.3.1 Zielgerichtete Therapieansätze

Zielgerichtete Therapien (engl. *Targeted Therapies*) sollen gezielt molekulare Mechanismen inhibieren, die im Tumor dereguliert vorliegen und zur Tumorentstehung oder dem Tumorprogress beitragen (2). Dabei wirken sie spezifisch auf molekulare Marker ein. Zu diesen zählen insbesondere Proteine, die Einfluss auf die Angiogenese und das Überleben der Tumorzellen nehmen, aber auch Proteine, die direkt oder indirekt das Immunsystem beeinflussen. Das NZK wird den angiogenen Tumoren zugeordnet (68). So führt der Verlust von VHL zur Aktivierung von HIF und somit zur erhöhten Expression endothelialer Wachstumsfaktoren (insbesondere VEGF), die in einer gesteigerten Angiogenese münden (siehe 1.2). Sie sind am Progress des NZK zentral beteiligt und aktivieren die korrespondierenden Rezeptoren wie den VEGF-Rezeptor (VEGF-R). Dafür verantwortlich sind Mutationen, die zur Veränderung von Proteinen des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges und dem Verlust von VHL führen. Entsprechend sind in der Europäischen Union (EU) zahlreiche Substanzen wie Tyrosinkinase- (TKI), Multikinase- und mTOR-Inhibitoren zugelassen, die diese Deregulation regulieren sollen (13). Da das NZK zudem das Immunsystem zu umgehen vermag, wurden auch hier gezielte Therapieansätze neu etabliert. So stehen Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI), insbesondere in Kombination mit einem TKI (Pembrolizumab / Avelumab + Axitinib) oder einem weiteren ICI (Ipilimumab + Nivolumab), für die Erstlinien- oder alleine für die Zweitlinien-Behandlung des metastasierten NZK (mNZK) zur Verfügung (Abbildung 3) (13).

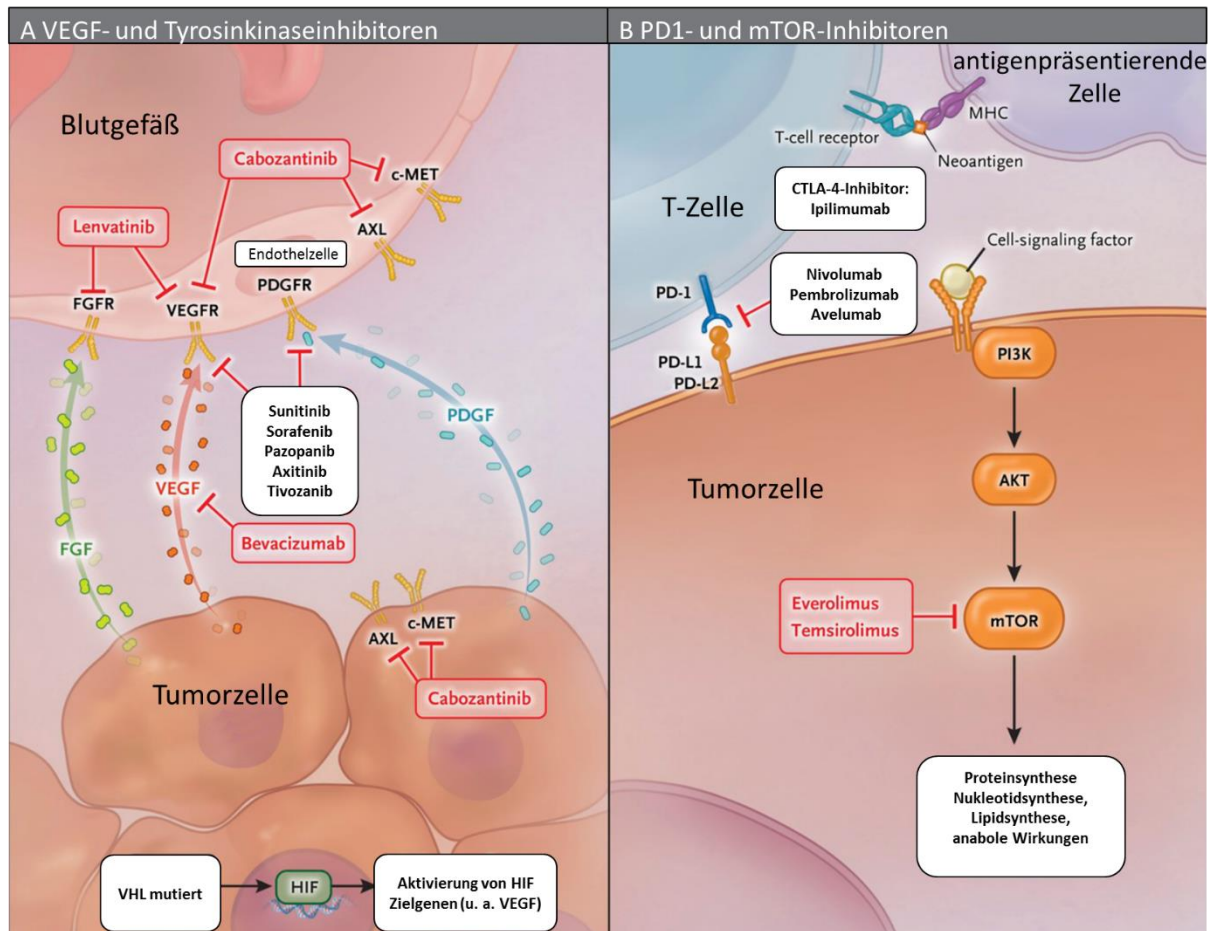


Abbildung 3: Übersicht der zielgerichteten Therapieansätze beim NZK (abgeändert von Choueiri und Motzer 2017 (67))

1.3.1.1 Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI)

Der Wirkungsbereich von TKI ist breit gefächert. Ein zentraler Punkt in der Behandlung des NZK ist die Inhibition der Angiogenese (69) (siehe Abbildung 3). Ziel ist es dabei, die aktivierende Wirkung von Wachstumsfaktorrezeptoren auf Endothelzellen, z. B. durch Botenstoffe wie VEGF, den Wachstumsfaktor aus Thrombozyten (PDGF - *Platelet-derived Growth Factor*) oder den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF - *Epidermal Growth Factor*), zu blockieren und somit den Tumoren die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff zu entziehen (67). Aber auch die Proliferation und das Wachstum von Tumorzellen soll durch den Einsatz von TKI gehemmt werden. So inhibieren die etablierten TKI nicht nur spezifisch einzelne Rezeptortyrosinkinasen, sondern können vielmehr als Multikinase-Inhibitoren bezeichnet werden, die wiederum das Tumorstadium und die Zellproliferation reduzieren (70). Die Behandlung mit den Wirkstoffen Sunitinib und Sorafenib zählt zu den ersten TKI-basierten und zielgerichteten Therapieoptionen beim NZK (71).

Sunitinib (Sutent®) zählt zu den Multikinase-Inhibitoren der ersten Generation und hemmt die VEGF-Rezeptoren 1 – 3, PDGF-alpha- und -beta-Rezeptor (PDGFR- α , PDGFR- β), weiterhin den Stammzellfaktorrezeptor (KIT), den Rezeptor der fms-ähnlichen Tyrosinkinase 3 (FLT-3 - *FMS-like Tyrosine Kinase 3*) sowie die Rezeptortyrosinkinase Ret und den Ras (*Rat Sarcoma*)/Raf (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*)/MEK (*Mitogen-activated Protein Kinase Kinase*)/ERK (*Extracellular-signal Regulated Kinases*)-Signalweg (70). Der Wirkstoff ist seit 2007 in der EU zur Behandlung des fortgeschrittenen NZK in der Erst- und Zweitlinie zugelassen (72). Es bietet beim fortgeschrittenen NZK gegenüber Sorafenib ein längeres Gesamtüberleben (OS), allerdings verbunden mit einer höheren Toxizität (73).

Sorafenib (Nexavar®) ist ein Multikinase-Inhibitor des VEGF-Signalweges, des PDGF-Rezeptors und der Raf-Kinase. In einer Phase II-Studie konnte das Medikament das progressionsfreie Überleben (PFS - *Progression-free Survival*) gegenüber einer Placebo-Gruppe signifikant steigern und somit den Krankheitsverlauf stabilisieren (74). Es ist seit 2006 in der EU für das fortgeschrittene NZK nach Versagen der Erstlinientherapie zugelassen (75).

Zu den TKI der neuen Generation zählen Pazopanib, Axitinib, Lenvatinib, Tivozanib und Cabozantinib.

Pazopanib (Votrient®) hemmt die Rezeptorbindung von VEGF, PDGFR und KIT. Das Medikament ist seit 2010 als Erstlinientherapeutikum in der EU zugelassen (76) und wird oral appliziert. Eine Phase III-Studie zeigte einen signifikanten Anstieg des PFS auf 9,2 Monate gegenüber der Placebo-Gruppe mit 4,2 Monaten. Das OS konnte jedoch nicht signifikant verlängert werden (77).

Axitinib (Inlyta®) ist in der Zweitlinie in der EU seit 2012 zugelassen (78). In der Erstlinie bietet Axitinib gegenüber Sorafenib keine Vorteile. Eine Phase III-Studie konnte keine signifikante Änderung des Gesamtüberlebens unter Axitinib (21,7 Monate) gegenüber Sorafenib (23,3 Monate) zeigen (79). In der Erstlinie kommt Axitinib in Kombination mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren (Pembrolizumab oder Avelumab) zum Einsatz (80).

Lenvatinib (Lenvima®) hemmt VEGFR 1 – 3 (81), Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor 1 – 4 (FGFR - *Fibroblast Growth Factor Receptor*), PDGFR- α , KIT und Ret (82, 83). Es ist seit 2016 in der EU in Kombination mit dem mTOR-Inhibitor Everolimus (Afinitor®) nach Therapieversagen eines Erstlinien-TKI zugelassen (84). In der Zulassungsstudie verlängerte die Kombinationsgabe das PFS auf 14,6 Monate im Vergleich zur Everolimus-Monotherapie mit 5,5 Monaten (85).

Tivozanib (Fotivda®) hemmt VEGFR 1 – 3 und ist in der Erstlinie beim fortgeschrittenen NZK seit 2017 in der EU zugelassen (86, 87). In der Zweitlinie konnte Tivozanib das PFS gegenüber Sorafenib signifikant steigern (88).

Cabozantinib (Cabometyx®) hemmt AXL (Tyrosin-Protein-Kinase-Rezeptor UFO), MET (*Tyrosine-protein Kinase Met*), VEGFR 1 – 3, KIT, die Tropomyosin-Rezeptorkinase B (TRKB - *Tropomyosin Receptor Kinase B*), FLT-3 und Ret (89). Der Wirkstoff ist seit 2018 in der EU nach Therapieversagen eines Erstlinien-TKI zugelassen (90). Im Vergleich zu Everolimus konnte Cabozantinib in der Zweitlinie das PFS von 3,8 Monaten auf 7,4 Monate verlängern (91).

Eine weitere Möglichkeit, den VEGF-Signalweg zu inhibieren, ist der Einsatz von monoklonalen Antikörpern, die spezifisch an den Wachstumsfaktor VEGF binden. Somit wird die Rezeptoraktivierung unterdrückt und die Signalübertragung wachstumsstimulierender Prozesse verhindert.

1.3.1.2 VEGF-Inhibitor

Bei Bevacizumab (Avastin®) handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, welcher VEGF bindet. Avastin® ist in Kombination mit Interferon (IFN) α in der Erstlinie zur Behandlung des fortgeschrittenen NZK in der EU seit 2007 zugelassen (92).

1.3.1.3 Immuntherapien

Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI):

Das *Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4* (CTLA-4), das *Programmed Cell Death Protein 1* (PD-1) und der Ligand PD-L1 kann durch sogenannte Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI) angegriffen werden (93). CTLA-4 wird auf der Oberfläche von T-Zellen konstitutiv exprimiert, wirkt immunsupprimierend und verhindert somit eine Überreaktion des Immunsystems auf Antigene. Auf die gleiche Art wird die Erkennung von Krebszellen unterbunden (94). So ist eine hohe CTLA-4-Expression beim NZK mit einer negativen Prognose verbunden (95). Das Protein kann therapeutisch inhibiert werden. Dazu steht der monoklonale Antikörper Ipilimumab zur Verfügung. Eine Inaktivierung von CTLA-4 resultiert in einer verstärkten T-Zell-Antwort. Dies führt zum Absterben der Tumorzelle durch Infiltration von Lymphozyten (94). In der Erstlinie ist die Kombination von Nivolumab mit Ipilimumab seit 2019 in der EU zugelassen. In einer Phase III-Studie konnte herausgestellt werden, dass die Kombinationstherapie von Nivolumab und Ipilimumab gegenüber Sunitinib bei fortgeschrittenen Patienten Vorteile erzielte (96). So stieg das PFS auf 11,6 Monate gegenüber 8,4 Monate bei Sunitinib-Einzelgabe (96). Weiterhin konnte das OS (Zeitraum

18 Monate) bei Ansprechen in der ICI-Kombinationstherapie gegenüber Sunitinib signifikant gesteigert werden (96).

PD-1 wird ebenfalls auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert. Kommt es zur Bindung mit dem Liganden PD-L1 auf Tumorzellen, führt dies zu einer reduzierten T-Zell-Aktivität bzw. Hemmung der Immunantwort (97). Zur Therapie stehen Inhibitoren gegen PD-1 (Nivolumab und Pembrolizumab) und seinen Liganden PD-L1 (Avelumab) zur Verfügung (98). Monoklonale Antikörper binden dabei PD-1 auf der Zelloberfläche von T-Zellen und verhindern die Inaktivierung (Immunsupprimierung) mit PD-L1, dem Liganden auf (hier) den Tumorzellen (99) oder umgekehrt. ICI gewinnen vermehrt an Bedeutung in der Erstlinientherapie in Kombination mit TKI (100), derzeit mit Axitinib (101).

1.3.1.4 mTOR-Inhibitoren

Die Gruppe der mTOR-Inhibitoren stellt eine weitere Behandlungsoption dar, die jedoch zunehmend durch das Aufkommen von ICI an Bedeutung verliert. Zwei zugelassene Medikamente dieser Stoffgruppe hemmen spezifisch das Enzym mTOR und unterbinden somit Wachstum und Überleben der Tumorzellen.

Temsirolimus (Torisel®): Das Derivat des Immunsuppressivums Rapamycin (Sirolimus), ist ein spezifischer Inhibitor von mTOR und wird intravenös appliziert. Studien zeigen signifikante Vorteile gegenüber der Monotherapie mit IFN α (10,9 Monate gegen 7,3 Monate) (102). Das Medikament ist seit 2007 in der Zweitlinie nach TKI-Versagen oder in der Erstlinie für Patienten mit schlechter Prognose zugelassen (103).

Everolimus (Afinitor®): Ein weiterer mTOR-Inhibitor steht mit RAD001 (Everolimus) zur Verfügung. Das Medikament ist in der EU seit 2009 in der Zweitlinie nach TKI-Versagen für alle Risikofaktoren zugelassen (104). Eine Phase III-Studie zeigte, dass das PFS im Median bei 4 Monaten gegenüber 1,9 Monaten der Placebogruppe lag (105).

1.4 Resistenzproblematik in der Behandlung des fortgeschrittenen NZK

Die bisher zugelassenen medikamentösen Behandlungsstrategien können häufig zunächst gute Erfolge erzielen (13). Die Behandlung mündet jedoch in fast allen Fällen in einer erworbenen Therapieresistenz (64, 106) und ist daher als palliative Therapie anzusehen. Eine Heilung ist im fortgeschrittenen Stadium selten. Auch native Resistenzen limitieren den Behandlungserfolg (106). So sprechen bereits 20 – 30 % der Patienten nicht auf die initiale Therapie an und zeigen einen Progress nach einer Therapiezeit von weniger als 3 Monaten (107). Wird der Median des PFS bei Therapieansprechen auf ein Erstlinien-TKI (Sorafenib, Sunitinib, Axitinib) betrachtet, so liegt dieser bei 8,4 Monaten (108). Aber auch 74 % der operierten, ohne diagnostizierbare Metastasen und mit zielgerichteten Therapien behandelten Patienten zeigen einen Rückfall innerhalb von 5 Jahren (109). Die Therapieresistenz basiert auf unterschiedlichen zellulären Antworten. So führt die Blockade von Rezeptortyrosinkinasen mit einem TKI, wie Sunitinib, zu einer Hypoxie und als Antwort darauf zu einer hochregulierten Expression von Wachstumsfaktoren. Durch die Überproduktion alternativer endothelialer Wachstumsfaktoren (110), welche Wachstumsreize in die Zelle leiten und so die Aufgabe der blockierten Rezeptortyrosinkinase übernehmen, entstehen *Escape*-Mechanismen (111). Einen weiteren Faktor in der Resistenzentwicklung nimmt das Ausschleusen von Medikamenten aus der Zelle ein. So stimuliert Sunitinib die Expression des Transporterproteins ABCB1 (ATP-Bindungskassette, Unterfamilie B), das den Zellausfluss begünstigt (112). Im Fall von Sunitinib ist dies zumindest teilweise auf die lysosomale Sequestration des TKI (113) und dem Verschmelzen mit Autophagosomen zu Autophagolysosomen zurückzuführen (64, 114). Diskutiert wird ebenfalls die Rolle von micro-Ribonukleinsäuren (miRNAs) in der Resistenzentstehung, bei denen es sich um hochkonservierte und nichtkodierende RNAs handelt, die genregulierend wirken. Unter ihnen konnten bereits mehrere Kandidaten identifiziert werden, die unter Sunitinib-Resistenz hochreguliert vorlagen, wie beispielsweise die miR-15b (115). Ihre Überexpression resultiert in einem fortschreitenden Zellzyklus und geringerer Apoptose nach Sunitinib-Gabe (115). Die Entwicklung wirkungsvollerer Therapien und die Überwindung von Therapieresistenzen stellen Kernthemen aktueller Forschungsbemühungen dar. Naturstoffe könnten hier aufgrund ihrer multifunktionalen Wirkung für die Etablierung neuer Therapiestrategien äußerst vielversprechend sein.

1.5 Naturstoffe und komplementäre alternative Medizin

Naturstoffe sind organische und anorganische chemische Verbindungen, Substanzen und Stoffgemische. Eine heilende Wirkung verschiedener natürlicher pflanzlicher Substanzen ist vielfach beschrieben (116). Die Wirkung der Naturstoffe basiert hierbei häufig auf sekundären Pflanzenstoffen. Insbesondere fernöstliche Länder nutzen seit Jahrtausenden Naturstoffe, um verschiedenste Krankheitsbilder zu therapieren (117, 118). Die Traditionelle Chinesische Medizin (TCM) nimmt in der chinesischen Kultur heute noch eine wichtige Rolle ein (119). Aber auch in der westlichen Geschichte ist die Anwendung natürlicher Substanzen fest verankert (120). Eine Integration von komplementären und alternativen Therapieansätzen (CAM - *Complementary and Alternative Medicine*) wird von Patientenseite vermehrt auch in der westlichen Welt in Betracht gezogen (121). Nicht zuletzt in der Krebstherapie, da diese gerade im fortgeschrittenen Stadium oft eine zeitliche Limitierung der Behandlung aufweist und mit starken Nebenwirkungen im Therapieverlauf assoziiert ist (122). Klinische Studien (aus Regensburg und München) stellten heraus, dass 15 – 30 % der Krebspatienten eine CAM-basierte Therapie selbst anwenden (123-126). Von der Behandlung mit Natursubstanzen erhoffen sich Patienten eine wirkungsvollere Therapie mit weniger Nebenwirkungen (124, 126). Ein Problem in der Anwendung von Naturstoffen besteht darin, dass Patienten die Einnahme oft nicht mit dem behandelnden Onkologen kommunizieren, diese daher nicht in das Therapiekonzept eingebunden werden und es somit zu unerwünschten Wechselwirkungen mit der Leitlinientherapie kommen kann (124). Häufig fehlen zudem klinische Daten zur Wirksamkeit der Naturstoffe. Die Datenlage verbesserte sich jedoch in den letzten Dekaden zunehmend. Eine antitumorale Wirkung von Naturstoffen konnte bisher bei verschiedenen urologischen Tumorentitäten nachgewiesen werden. So zeigte Curcumin, ein Naturstoff aus der Gelbwurzel, *in vitro* bereits eine inhibitorische Wirkung beim Nierenzell- (127) und beim Urothelkarzinom (128) unter dem Einfluss einer Lichtstimulation. Sulforaphan, ein sekundärer Pflanzenstoff aus dem Brokkoli, konnte zusätzlich zu seiner antitumoralen Wirkung (129) unter chronischer Gabe eine Resistenzentstehung in NZK-Zellen vermeiden (130). Amygdalin aus den Kernen von Steinfrüchten zeigte eine antitumorale Wirkung bei urologischen Tumorzellen der Blase (131), der Prostata (132) und der Niere (133). Deutlich wird, dass Naturstoffe eine additive Therapieoption urologischer Tumore darstellen könnten. Substanzen aus der TCM spielen dabei eine immer wichtigere Rolle (134, 135). Artesunat (ART), abgeleitet von Artemisinin, und Shikonin (SHI) zeigten bereits eine antitumorale Wirkung auf verschiedenste Tumore (136, 137) und könnten somit auch beim NZK, ggf. sogar beim therapieresistenten NZK, eine vielversprechende Therapieoption darstellen.

1.5.1 Artemisinin – Artesunat (ART)

Der sekundäre Pflanzenstoff Artemisinin findet seit 2.000 Jahren Anwendung in der TCM (138). Lokalisiert ist dieser in den Blättern und der Blüte des einjährigen Beifußes (*Artemisia annua*), im Chinesischen unter „qing hao“ bekannt. In der TCM findet Artemisinin eine sehr breite Anwendung, vor allem jedoch direkt oder indirekt in der Behandlung von Malariainfektionen (139). Dabei werden die getrockneten Blätter in verschiedenen Kombinationen als kalter Kräutertee gereicht. Der semi-synthetische Arzneistoff ART, ein Derivat von Artemisinin, zeigt im Gegensatz zum Naturstoff hydrophile Eigenschaften mit einer besseren Bioverfügbarkeit und weniger Nebenwirkungen (136, 140) (Abbildung 4). Auch wenn der Wirkmechanismus von Artemisinin noch nicht vollständig geklärt ist, ist offensichtlich die labile Endoperoxid-Brücke von Artemisinin (und ART) involviert und die damit verbundene Bildung von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS - *Reactive Oxygen Species*). Zumindest in der Malariabehandlung ist dafür Eisen in der Nahrungsvakuole des Einzellers aus der Gattung *Plasmodium* mit verantwortlich (141).

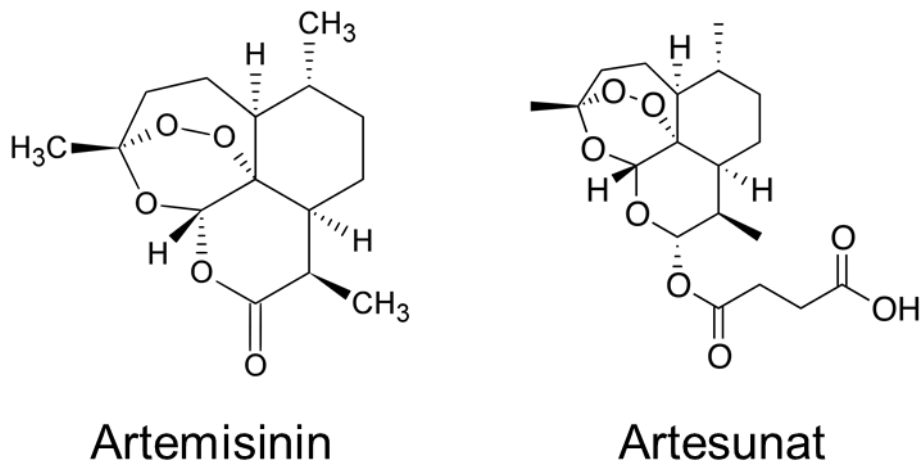


Abbildung 4: Strukturformel von Artemisinin und Artesunat v. l. n. r.

Die antitumorale Wirkung von ART konnte bereits belegt werden (142). Die Arbeitsgruppe um Hambacher-Brady in Heidelberg konnte an Brustkrebszellen belegen, dass ART in Kombination mit lysosomalem Eisen zur ROS-Entstehung führt und die Apoptose auf dem intrinsischen Weg induziert (143). Studien zeigen *in vivo* und *in vitro* einen Einfluss von ART auf unterschiedliche Karzinome (142). In T-Zell-Leukämiezellen (144) und auch in Doxorubicin-resistenten T-Zell-Leukämiezellen vermochte ART die Apoptose zu induzieren und zeigte dabei synergistische Effekte in der Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin (144). Die Behandlung von kastrationsresistenten Prostatakarzinomzellen mit ART führte zu einem erneuten Ansprechen auf Antiandrogene (145). Ebenfalls konnte der positive Effekt bei Karzinomen des Gastrointestinaltraktes (146) und bei Brustkrebsstudien nachgewiesen werden (143). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ART hauptsächlich im erkrankten

Gewebe wirkt und gesundes Gewebe verschont bleibt (147). Im therapiesensitiven NZK wurde zudem eine potente selektive Zytotoxizität von ART nachgewiesen (148). Diese ist unter anderem gekennzeichnet durch die Inhibition der invasiven Eigenschaften des NZK *in vitro* und *in vivo*. Weiterhin zeigte ART in Kombination mit Sorafenib im NZK (148) und Leberzellkarzinom (149) eine Wirkungsverstärkung des TKI. Beim Leberzellkarzinom ging dies mit ferroptotischen Effekten einher (150). Die Ferroptose, ein relativ neu beschriebener Weg des programmierten Zelltods, könnte auch beim NZK eine Rolle spielen (151). Dass ART Ferroptose induzieren kann, ist vielseitig beschrieben (151-153). Dabei ist, wie bei der Malariabekämpfung, die Anwesenheit von Eisen wichtig und der damit einhergehende Anstieg an ROS. Beim NZK ist eine erhöhte Eisenabhängigkeit erkennbar. So ist der Transferrin-Rezeptor 1 (TFR1), im Vergleich zum Normalgewebe, hochreguliert (154). Das Transmembranprotein reguliert das Einschleusen von Eisenionen und korreliert mit dem Progress und der Mortalität von NZK-Patienten. So zeigen klarzellige NZK-Zelllinien potenziell die Fähigkeit, die Ferroptose zu induzieren (155). Der VHL-Status könnte dabei eine Schlüsselfunktion einnehmen (156). Besonders bei VHL-defekten NZK-Zellen konnte eine hohe Ferroptose-Sensitivität detektiert werden (156). Daten über die Wirkung von ART in therapieresistenten NZK liegen derzeit nicht vor.

1.5.1.1 Ferroptose

Die Ferroptose ist eine Form des programmierten Zelltods und abhängig von unterschiedlichen Faktoren. Morphologisch wird sie geprägt von einem Aufbrechen der Zellmembran, Verdichtung von Mitochondrien (Schrumpfen) und Kondensation der Mitochondrienmembran bei normaler Kerngröße (157). Im Vergleich zur Apoptose erfolgt die Ferroptose Caspase-unabhängig. Grundlage für die Ferroptose-Induktion ist ein erhöhter Anteil an aktivem Eisen, der namensgebend ist. Schlüsselproteine bilden Glutathion (GSH) und die *Phospholipid-Hydroxyperoxid-Glutathion-Peroxidase* (PHGPx, Gen: *GPX4*), die als Regulatoren bei einem erhöhtem ROS-Aufkommen fungieren (Abbildung 5).

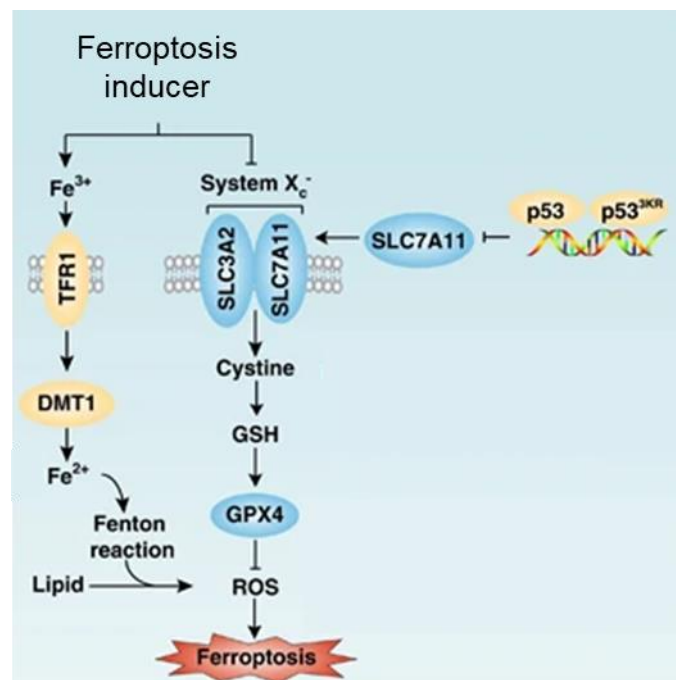


Abbildung 5: Der Ferroptose Signalweg (abgeändert von Xie *et al.* 2016 (157))

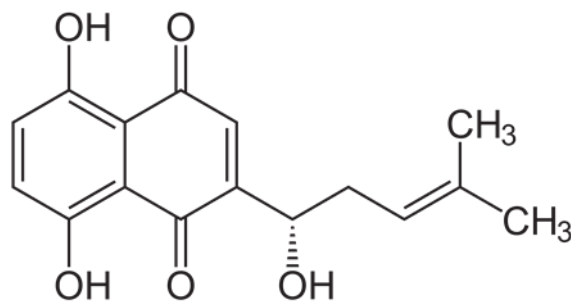
Extrazelluläres Eisen wird dabei über den TFR1-Transporter in das Zellinnere eingeschleust. TFR1 bildet mit Transferrin (TF) einen membrangebundenen Komplex. Die Membrandurchquerung erfolgt über Endozytose des eisengebundenen Transferrins. Im Zelllumen wird das eisengebundene Transferrin entkoppelt und der Transferrin-Komplex erneuert (158). Ein weiteren Weg der Aufnahme von Eisen bietet der unspezifische Metallionentransporter DMT1 (*Divalent Metal Transporter 1*) (159). Das in das Zelllumen freigesetzte zweiwertige Eisen führt dabei unter Teilnahme der Fenton-Reaktion (siehe Abbildung 5) zum Anstieg von ROS und in der Folge zur Lipidperoxidation.

Das Tripeptid GSH ist das stärkste körpereigene Antioxidans und entsteht aus den Aminosäuren Glutamin, Cystein und Glycin (160). Das Substrat zur Biosynthese von GSH stellt Cystein dar, das über das System X_c⁻ (heterodimer, mit einer leichten (xCT) (SLC7A11 -

Cystine/Glutamate Transporter) und einer schweren (4F2) (SLC3A2 - *4F2 Cell-surface Antigen Heavy Chain*) Seitenkette) eingeschleust wird und einen natriumabhängigen Antiporter darstellt (157). Unter Anwesenheit von ROS wird die Glutaminsäure des GSH oxidiert und es kommt zur Konformationsänderung vom Monomer zum Dimer. Die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei oxidierten GSH-Molekülen führt dabei zum Glutathion-Disulfid (GSSG). Der Prozess ist unter Beteiligung des Enzyms Glutathion-Reduktase unter NADPH-Verbrauch (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat) reversibel. Das auf dem Gen *GPX4* kodierte PHGPx ist ein weiterer Bestandteil des oxidativen Schutzsystems. Das Protein katalysiert die Oxidation von GSH durch Lipidhydroperoxide. Das Protein p53 kann Zellen für die Ferroptose sensibilisieren, indem es die Expression von *SLC7A11* transkriptionell unterdrückt (161) (siehe Abbildung 5) und damit den Import von Cystein und die Synthese von GSH unterbindet. Der Ausfall des oxidativen Schutzsystems oder die Schwellenwertüberschreitung von ROS führen zur Membranpermeabilisierung und somit zur Ferroptose (157).

1.5.2 Shikonin (SHI)

SHI (Abbildung 6), gewonnen aus der getrockneten Wurzel von *Lithospermum erythrorhizon*, weist ebenfalls antitumorale Eigenschaften auf (162). Es konnte dabei eine Wirkungsverstärkung anderer antitumoraler Therapeutika induzieren (163) und therapieresistenten Magen- (Chemotherapie) und Lungenkrebs (TKI) resensibilisieren (164, 165). Der genaue Wirkmechanismus von SHI ist dabei noch weitestgehend unbekannt. Eine Selektivität der Wirkung auf erkranktes Gewebe konnte in *in vitro*-Untersuchungen beim Prostatakarzinom gezeigt werden (166). Ein Ansprechen auf SHI konnte nur bei malignen Zellen bewiesen werden, benigne hingegen reagierten nicht. Es gibt erste Hinweise, dass SHI auf Signalwege einwirkt, die für die Regulation des Zellzyklus mitverantwortlich sind, und so einen Zellzyklusarrest hervorruft (167). SHI lagert sich zudem in den Mitochondrien (den „Energiezentrum“) von Krebszellen an und induziert dort die Apoptose (167, 168). Weitere Analysen zeigen einen inhibitorischen regulatorischen Effekt (169) auf das Protoonkogen c-Myc (170). Eine aktuelle Studie zeigt die Beteiligung von c-Myc nicht nur an Wachstum und Differenzierung, sondern auch an der Metastasierung von Tumoren (171, 172). Weiterhin kann SHI den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg modulieren (173).



Shikonin

Abbildung 6: Strukturformel von Shikonin

SHI ist zudem ein spezifischer Inhibitor der Pyruvatkinase-M2 (PKM2) (174), die nur in Tumoren und in der Embryonalentwicklung exprimiert wird (175). Im Zellkulturmodell am NZK konnte gezeigt werden, dass das Ausschalten der Kinase zu einer Reduktion der Proliferation, des Metabolismus und der Migration führt (176). Ebenfalls ist bekannt, dass SHI die Nekroptose induzieren kann, eine Form der regulierten Nekrose, die unter Einbindung der Rezeptor-interagierenden Serine/Threonine-Proteinkinase 1 (RIP1) und 3 (RIP3) erfolgt (177). Zum therapieresistenten NZK liegen bisher jedoch keine Daten zur Wirkung von SHI vor.

1.5.2.1 Nekroptose

Die Nekroptose oder regulierte Nekrose ist ein Caspase-unabhängiger Zelltod (178). Sie bietet eine weitere Möglichkeit, den Zelltod kontrolliert einzuleiten, auch wenn andere regulatorische Mechanismen, wie zum Beispiel die Apoptoseinduktion, versagen. Dies kann nach Virusinfektionen geschehen oder in Tumoren (179). Morphologisch ist die Nekroptose durch das Anschwellen von Zellorganellen, das Aufbrechen der Zellmembran und die Kondensation des Chromatins gekennzeichnet (180). Schlüsselproteine der Nekroptose sind RIP1, RIP3 und das *Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein* (MLKL) (181). Ein regulierender Faktor ist dabei die Caspase 8. Die aktivierte Caspase 8 inaktiviert RIP1 und RIP3 und induziert die Apoptose auf dem extrinsischen Weg. Eine inaktive Caspase 8 resultiert hingegen in der Nekroptose (181) (Abbildung 7).

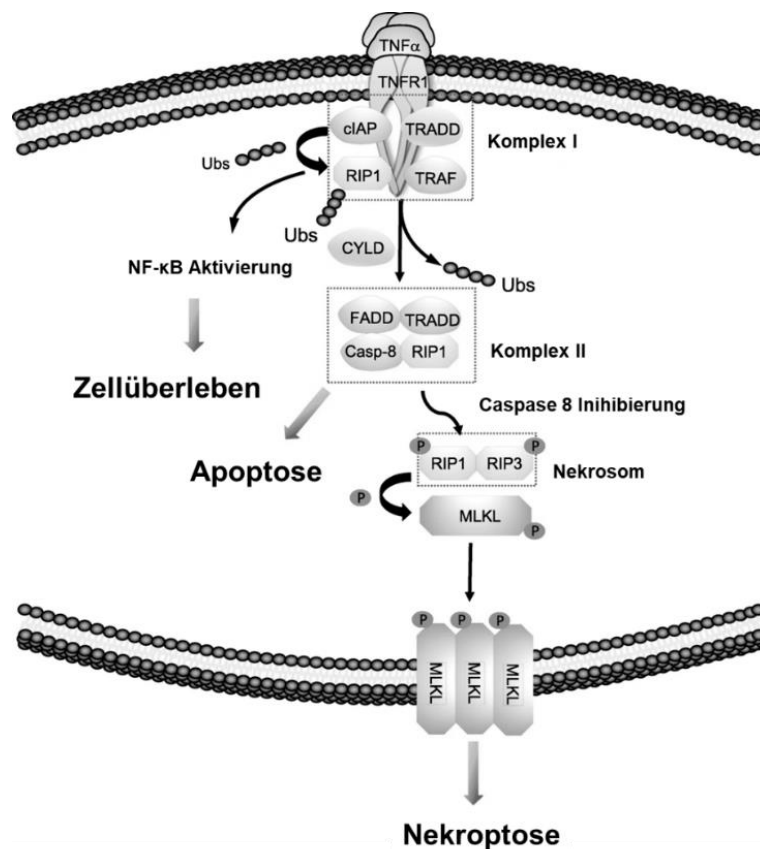


Abbildung 7: Der Nekroptose-Signalweg (abgeändert von Gong *et al.* 2019 (181))

Auch der Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR) nimmt eine zentrale Rolle in der Aktivierung des Nekroptose-Signalweges ein (181). Die Konformationsänderung von TNFR1 durch TNFα (Tumornekrosefaktor) führt zu einer multimeren Proteinkomplexbildung, in dem RIP1 eine entscheidende Rolle einnimmt. Im Komplex 1 liegt RIP1 ubiquitiniert vor und führt durch NFκB-Aktivierung (*Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of Activated B-cells*) zum Zellüberleben. Im Komplex 2 wird in Abhängigkeit von Caspase 8 entweder die Apoptose

oder die Nekroptose induziert. Deubiquitiniertes RIP1 im Komplex mit *Fas-associated Protein with Death Domain* (FADD) und *Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1-associated DEATH Domain Protein* (TRADD) aktiviert die Caspase 8 und führt so zur Apoptose. Die Nekroptose wird hingegen, wie oben beschrieben, durch die inaktivierte Caspase 8 induziert. Hierbei kommt es zur Rekrutierung von RIP3 und zur Komplexbildung, dem Nekrosom. Der Komplex führt zur Phosphorylierung und damit Aktivierung von MLKL. Der Prozess endet in der Oligomerisierung des Proteins und ermöglicht das Eindringen in Membranen von Zellen und Organellen (179, 181). Dies führt zur Membranpermeabilisierung und mündet in inflammatorischen Prozessen, die mit einer Immunantwort und Aktivierung des Zytokins IL-1 β einhergehen (182).

1.6 Ziel der Studie

Ziel der Studie war es, die bestehende Resistenzproblematik beim NZK im Zellkulturmodell aufzugreifen. Dabei sollte untersucht werden, inwiefern ART und SHI die Limitierung der aktuellen Therapieoptionen (hier: Sunitinib) durch die entstehende Therapieresistenz aufheben und so ergänzend in die etablierten Therapiekonzepte integriert werden können. An einem Panel Sunitinib-resistenter NZK-Zellen wurde daher untersucht, inwiefern ART und SHI

- das Wachstum und die Proliferation zu hemmen vermögen.
- auf den Zellzyklus einwirken.
- verschiedene Zelltode induzieren.
- das Metastasierungsverhalten der Zellen beeinflussen können.
- entsprechende molekulare Modulationen hervorrufen.

Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte und therapiesensitive Zellen. Das klarzellige NZK stellt mit 80 % den überwiegenden Teil der malignen Nierenzelltumore dar (6). Um der Verteilungshäufigkeit gerecht zu werden, wurden verschiedene klarzellige NZK-Zelllinien, Caki-1, 786-O und KTCTL-26, herangezogen. Als Referenz diente weiterhin die Zelllinie A-498, die zwar aus der Niere stammt, jedoch pathologisch nicht eindeutig als klarzellig definiert ist (183). Mit der Studie sollte die Basis für ein neues Therapiekonzept geschaffen werden. Längerfristiges Ziel ist es, eine neue wirkungsvolle Behandlungsoption für Patienten mit fortgeschrittenem NZK anbieten zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalien

Name	Produktnummer	Firma	Firmensitz
Accutase [®] solution	A6964	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Acrylamid A, Rotiphorese [®] Gel A	3037.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Antibiotic-Antimycotic (100 x)	15240062	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
APS, Ammoniumperoxisdsulfat	9592.3	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Aqua dest., Ampuwa (H ₂ O _{dd})	7151-5	Fresenius Kabi AG	Bad Homburg, Deutschland
Artesunat	A3731	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Bisacryl B, Rotiphorese [®] Gel B	3039.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	A512.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
BSA (Bovine Serum Albumin)	A2153-100G	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
CellTracker Green CMFDA Dye, Molecular Probes	C7025	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Coomassie-Brillant-Blau G-250	9598.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Coomassie-Brillant-Blau R-250	3862.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
CS&T Research Beads	655050	Becton Dickinson	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Deferoxamin	D9533	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Dispase Neutral-Protease	LS02104	Worthington Biochemical Corporation	Lakewood, New Jersey, USA
DMSO, Dimethylsulfoxid	D8418	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
DTT, 1,4-Dithiothreitol (5 g)	6908.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
ECGS, Endothelial Cell Growth Supplement	C-30180	PromoCell	Heidelberg, Deutschland
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure	EDS-100G	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Essigsäure (100 %) (AcOH)	3738.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolut (EtOH)	A3678	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland

Material und Methoden

Name	Produktnummer	Firma	Firmensitz
FCS, Fetales Kälberserum (Gibco®)	10500-064	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Ferrostation-1	SM0583	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Fibronektin	356008	Corning® Inc.	Corning, New York, USA
Gentamycin-Sulfat [10 mg/ml]	882066	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Glutamax I Supplement	35050-038	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Glutaraldehyd-Lösung	G6257-1L	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Glycerin / Glycerol	3783.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Glycin	3790.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Heparin [5000 U/ml]	L6510	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
HEPES [1 M] Pufferlösung	15630106	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
holo-Transferrin	T0665	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Iscove Basal Medium, 500 ml	F 0465	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
Isopropanol	5001	Aug. Hedinger GmbH & Co. KG	Stuttgart, Deutschland
Kollagen, Collagen G	L7213	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
M199-Kulturmedium (500 ml)	M4530	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Magermilchpulver (nfd Milchpulver)	A0830,0500	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Mercaptoethanol	M6250-100ML	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Methanol (MeOH)	1060081000	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
MTT, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	M2128-5G	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
NaCl, Natriumchlorid	3957.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Na-deoxycholate	D5670-25G	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Necrostatin-1	SC-200142	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, USA
NP-40 Tergitol	NP40	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Nuklease free water UltraPure Distilled Water (Rnase/Rnase free)	10977-035	Invitrogen	Carlsbad, Kalifornien, USA

Material und Methoden

Name	Produktnummer	Firma	Firmensitz
PBS, Phosphatgepufferte Salzlösung mit MgCl ₂ und CaCl ₂	D8662-500ML	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
PBS, Phosphatgepufferte Salzlösung ohne MgCl ₂ und CaCl ₂	14190-094	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	P5726-5ml	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
PI (Propidium-Iodid)	P1304MP	Molecular Probes	Eugene, USA
PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride solution) [100 mM]	93482-50ML-F	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards	161-0375	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, USA
Protease Inhibitor Cocktail	P8340	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Radiance Plus ECL Lösung	512103	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
RNase A	R5125-25MG	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Rotiphorese 10 x SDS Laufpuffer	3060.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640 (500 ml)	R8758	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure HCl [1 N]	K025.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure HCl [5 M]	1.821.091.211	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure [1 N, 0,5 M]	K025.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	1610302	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, USA
Shikonin	S7576-10mg	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Sunitinib free Base	S-8877	LC Laboratories	Woburn, Massachusetts, USA
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	T 7042	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
terralin® liquid	102001	Schülke & Mayr GmbH	Hamburg, Deutschland
terralin® protect	181604	Schülke & Mayr GmbH	Hamburg, Deutschland
Tris	A411.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Tris-hydrochlorid (99 %) PUFFERAN	9090.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	A4975,0100	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Trizma® base (Tris)	T-8524	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland

Name	Produktnummer	Firma	Firmensitz
Trolox	238813	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Trypanblau (0,4 %)	T8154-100ml	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Trypsin EDTA (0,25 %)	T4049	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Tween 20	A4974,0100	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland

2.2 Material

Tabelle 3: Material

Produkt	Produktnummer	Firma	Firmensitz
Dichtung Mini-PROTEAN® Casting Stand Gaskets	1653305	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, USA
Einfrierhilfe CoolCell - Cell Freezing	210000 BCS-136	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Emsa Clip & Close Frischhaltedosen (0,55 l)	508570	Emsa GmbH	Emsdetten, Deutschland
Gel Releaser	1653320	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, USA
Gelgießrahmen	1658000	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, USA
Gelgießstand	1658000	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, USA
Glasplatte Short Plate	1653308	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, USA
Glasplatte Spacer Plate (1,5 mm)	1653312	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, USA
Kamm 10 well	1653359	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, USA
Kamm 15 well	1653360	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, USA
Kugel-Magnet 5 mm	B5 Magnetkugel	Brudazon UG	Hamm, Deutschland
Mini Scheiben-Magnet 1x1 mm	S1x1 mini Scheibenmagnet	Brudazon UG	Hamm, Deutschland

2.3 Verbrauchsmaterial

Tabelle 4: Verbrauchsmaterial

Produkt	Produktnummer	Firma	Firmensitz
Abdecktuch	ES15225CE	Medline International Germany GmbH	Kleve, Deutschland
Cell Counting Slides	L12001	logos Biosystems	Villeneuve d'Ascq, Frankreich

Material und Methoden

Produkt	Produktnummer	Firma	Firmensitz
Einmal-Pinzette, steril	8124658	Centramed Medizintechnik Beteiligungs GmbH	Koblenz, Deutschland
FACS-Röhrchen, Round-Bottom Tubes, Disposable, Polystyrene, Volume = 5 mL, Cap	352054	Corning® Inc.	Corning, New York, USA
Feuchttuch, Schülke wipes	119541	Schülke & Mayr GmbH	Hamburg, Deutschland
Filtereinheit, 0,20 µm, hydrophobes PTFE, 25 mm	SLFG025LS	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Filterpapier, Blotting paper FN 100 580 x 600 mm Thickness: ca. 0,35 mm, 195 g / m ²	GB58	A.Hartenstein	Würzburg, Deutschland
FluoroBlok™ Insert 8.0 µm pore size 24 well format	351152	Corning® Inc.	Corning, New York, USA
Klemmschere	229-0301	Thermo Scientific™ Nalgene®	Waltham, Massachusetts, USA
Kryoröhrchen für Biobanking und Zellkulturen	10674511	Thermo Scientific™ Nunc™	Waltham, Massachusetts, USA
Mikrotiterplatte Zellkultur, 96- Well PS, F-BODEN, weiss, CELLSTAR® TC, (KAMINFORM)	655083	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Mikrotiterplatte Zellkultur, 96- Well, transparent, Flachboden, steril	833924005	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Multititerplatte Zellkultur, 12- Well, transparent, Flachboden, steril	665180	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Multititerplatte Zellkultur, 24- Well, transparent, Flachboden, steril	662160	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Multititerplatte Zellkultur, 6- Well, transparent, Flachboden, steril	657160	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Multititerplatte, 24-Well, Companion Plate mit Membraneinsätzen	353504	Corning® Inc.	Corning, New York, USA
Pasteurpipetten 2 ml, L: 230 mm, Glas	612-1702	VWR	Radnor, Pennsylvania, USA
Pasteurpipetten 3 ml graduirt, Unsteril, 155 mm	EA65.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Petrischale 145 mm	639160	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitze 10 µl SurPhop mit Filter steril	VT0200	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland

Material und Methoden

Produkt	Produktnummer	Firma	Firmensitz
Pipettenspitze 10 µl SurPhop extra lang unsteril	VT0103	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze 100 µl SurPhop mit Filter steril	VT0230	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze 1250 µl SurPhop mit Filter steril	VT0270	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze 1250 µl SurPhop extra lang unsteril	VT0173	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze 20 µl SurPhop mit Filter steril	VT0220	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze 200 µl SurPhop mit Filter steril	VT0240	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze 200 µl SurPhop extra lang unsteril	VT0143	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
PVDF Membran Immun-Blot® (Rolle 0.2 µm, 26 cm x 3.3 m)	1620177	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, USA
Reagenzreservoir 25 ml steril	89094-664	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 ml Safe-Lock	0030121023	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml Safe-Lock	0030120086	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 2,0 ml Safe-Lock	0030120094	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Serologische Pipette 10 ml steril mit Filter	607180	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipette 2 ml steril mit Filter	710180	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipette 25 ml steril mit Filter	760180	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipette 5 ml steril mit Filter	606180	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipette 50 ml steril mit Filter	768180	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Skalpell Figur 23	Fig. 23	FEATHER Safety Razor Co., Ltd	Osaka, Japan
Spritze 10 ml exzentrisch	309110	Becton Dickinson	Franklin Lakes, New Jersey, USA
StarGuard Protect Nitril Handschuhe M	SG-P-M	STARLAB INTERNATIONAL GmbH	Hamburg, Deutschland
Urinbecher	C567-120CYS	Simport Scientific Inc.	Saint-Mathieu-de-Beloil, Kanada
Vasofix Safety Braunüle rosa 20G x 1 1/4"	20G	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland

Produkt	Produktnummer	Firma	Firmensitz
Zellkulturflasche 25 cm ²	833910002	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflasche 25 cm ² Cell+	833910302	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflasche 75 cm ²	833911002	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflasche 75 cm ² Cell+	833911302	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	831830	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml	188271	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Zentrifugenröhrchen 5,0 ml Eppendorf Tubes® mit Schraubdeckel	30122305	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 50 ml	227261	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich

2.4 Kits

Tabelle 5: Kits

Name	Produktnummer	Firma	Firmensitz
BrdU Cell Proliferation Kit	QIA58	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	556547	Becton Dickinson	Franklin Lakes, New Jersey, USA
GSH-Glo™ Glutathione Assay	V6911	Promega Corporation	Madison, Wisconsin, USA

2.5 Geräte

Tabelle 6: Geräte

Gerät	Produktnummer	Firma	Firmensitz
Absaugsystem VACUSAFE	158320	INTEGRA Biosciences GmbH	Biebertal, Deutschland
Analysenwaage	L2200P	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Axiocam 503 color	503 color	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Axiocam 503 mono	503 mono	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Axiocam ICM1	ICM1	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
BD FACSCalibur™ Durchflusszytometer		Becton Dickinson	Franklin Lakes, New Jersey, USA

Material und Methoden

Gerät	Produktnummer	Firma	Firmensitz
BD FACSTFlow Supply System	649908	Becton Dickinson	Franklin Lakes, New Jersey, USA
BD HTS High Throughput Sampler	647701	Becton Dickinson	Franklin Lakes, New Jersey, USA
BD LSRFortessa X-20 Durchflusszytometer	657669 (Special Order)	Becton Dickinson	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Bunsenbrenner, FIREBOY eco	451-0136	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
CO ₂ Inkubator Heracell 150		Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
CO ₂ Inkubator Heracell VIOS 160i	51030286	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Finnpipette F2 0.2 bis 2 µl	4642010	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Finnpipette F2 1 bis 10 µl	4642030	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Finnpipette F2 10 bis 100 µl	4642070	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Finnpipette F2 100 bis 1000 µl	4642090	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Finnpipette F2 2 bis 20 µl	4642050	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Finnpipette F2 20 bis 200 µl	4642080	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Herasafe™ KS Sicherheitswerkbank	42016188	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Inverses Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1	491915-0001-000	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Inverses Mikroskop AE2000 Binocular	630-1316	Motic Deutschland GmbH	Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte VWR VMS-C7	442-0664	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Mikroskop Axiovert 40 CFL	491202-0002-001	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Mikrozentrifuge, Hereaus Fresco 21	75002425	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA

Material und Methoden

Gerät	Produktnummer	Firma	Firmensitz
Mini Trans-Blot® Cell	1703930	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, USA
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell for Mini Precast Gels, 4-gel	1658004	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, USA
pH Meter, Orion Star A111	11661399	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Pipettierhilfe accu-jet® pro	26301	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Plattenlesegerät Tecan US Inc. Spark 10M	30086375	Tecan Group AG	Männedorf, Schweiz
PowerPac™ Basic Power Supply	1645050	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, USA
PowerPac™ HC Power Supply	1645052	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, USA
Präzisionswaage		Sartorius	Göttingen, Deutschland
Rollenmischer Stuart SRT9	1126-302-02	Cole-Parmer	Stone, Großbritannien
Roller	1651279	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, USA
Sapphire Biomolecular Imager	IS1026	Azure Biosystems	Dublin, California, USA
Schütteltisch - See-saw rockers	SSL4	Cole-Parmer	Stone, Großbritannien
ThermoCell MixingBlock	MB-102 (MB-101)	Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd.	Hangzhou, China
Vibrationsmischer, Vortex	RS-VA 10	Phönix Instruments	Garbsen, Deutschland
Wasserbad Precision GP28	15315867	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Zellzähler, LUNA™ Automated Cell Counter	L10001	logos Biosystems	Villeneuve d'Ascq, Frankreich
Zentrifuge, Megafuge® 1.0R	75003060/02	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Zentrifuge, Megafuge® 16R	521-2065	Heraeus	Hanau, Deutschland

2.6 Software

Tabelle 7: Software

Name	Version	Firma	Firmensitz
AlphaView SA	3.4.0.	ProteinSimple	Santa Clara, Californien, USA
AzureCapture	1.1.0315.0	Azure Biosystems	Dublin, Californien, USA
AzureSpot	2.0.062	Azure Biosystems	Dublin, Californien, USA
BD CellQuest™ Pro	5.1	Becton Dickinson	Franklin Lakes, New Jersey, USA
BD FACSDiva™	8.0.2	Becton Dickinson	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Endnote	X9.3	Thomson Reuters	Toronto, Kanada
FlowJo	10.5.3.	Becton Dickinson	Franklin Lakes, New Jersey, USA
GraphPad Prism	7.04.	GraphPad Software, Inc.	San Diego, Californien, USA
ImageJ	1.48 v	Wayne Rasband / National Institutes of Health	Bethesda, Maryland, USA
Magellan	V 2.2	Tecan Trading AG	Männedorf, Schweiz
ModFit	5.0.9	Verity Software House	Topsham, Maine, USA
Office Professional Plus 2010	14.0.7237.5000	Microsoft Corporation	Seattle, Washington, USA
Zen	2.3.	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena, Deutschland

2.7 Antikörper Western-Blot

2.7.1 Zellzyklusregulierende Proteine

Tabelle 8: Antikörper Zellzyklusregulierende Proteine

Name	Klon	Hersteller	Nummer	Verdünnung	Herkunft
Anti-p21	12D1	Cell Signaling	#2947	1:1.000	Hase
Anti-p27	57/Kip1	BD	610242	1:500	Maus
Anti-Cyclin A	25/Cyclin A	BD	611269	1:500	Maus
Anti-Cyclin B	18/Cyclin B	BD	610220	1:1.000	Maus
Anti-CDK1	1/Cdk1/Ccdc 2	BD	610038	1:2.500	Maus
Anti-phospho-CDK1 (Tyr15)	10A11	Cell Signaling	#4539	1:1.000	Hase
Anti-CDK2	55/Cdk2	BD	610146	1:2.500	Maus
Anti-phospho-CDK2 (Thr160)	polyclonal	Cell Signaling	#2561	1:1.000	Hase

2.7.2 Zelltodproteine

Tabelle 9: Antikörper Zelltodproteine

Name	Klon	Hersteller	Nummer	Verdünnung	Herkunft
Caspase 8	D35G2	Cell Signaling	#4790	1:1.000	Hase
Caspase 3		Cell Signaling	#9662	1:1.000	Hase
PARP	46D11	Cell Signaling	#9532	1:1.000	Hase
RIP	D94C12	Cell Signaling	#3493	1:1.000	Hase
pRIP (Ser166)	D8I3A	Cell Signaling	#44590	1:1.000	Hase
GPX4		Abcam	ab41787	1:1.000	Hase

2.7.3 Standardproteine / Ladungskontrolle

Tabelle 10: Antikörper Standardproteine / Ladungskontrolle

Name	Klon	Hersteller	Nummer	Verdünnung	Herkunft
beta-Aktin	AC-15	Sigma-Aldrich	A5441	1:10.000	Maus
GAPDH	D16H11	Cell Signaling	5174S	1:1.000	Maus

2.7.4 Sekundäre Antikörper

Tabelle 11: Sekundäre Antikörper

Name	Klon	Hersteller	Nummer	Verdünnung	Herkunft
Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	polyclonal	Dako	P0448	1:1.000	Ziege
Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	polyclonal	Dako	P0260	1:1.000	Hase

2.8 Antikörper Durchflusszytometrie

2.8.1 Adhäsionsrezeptoren – Integrine

Tabelle 12: Antikörper Adhäsionsrezeptoren – Integrine

Bezeichnung	Name	Isotyp	Klon	Hersteller	Nummer	Verdünnung
PE Mouse Anti-Human CD49a	Integrin alpha 1	Maus IgG1, κ	SR84	BD	559596	gebrauchsfertig
PE Mouse Anti-Human CD49b	Integrin alpha 2	Maus IgG2a, κ	12F1	BD	555669	gebrauchsfertig
PE Mouse Anti-Human CD49c	Integrin alpha 3	Maus IgG1, κ	C3 II.1	BD	556025	gebrauchsfertig
PE Mouse Anti-Human CD49d	Integrin alpha 4	Maus IgG1, κ	9F10	BD	555503	gebrauchsfertig
PE Mouse Anti-Human CD49e	Integrin alpha 5	Maus IgG1, κ	IIA1	BD	555617	gebrauchsfertig
PE Mouse Anti-Human CD49f	Integrin alpha 6	Ratte IgG2a, κ	GoH3	BD	555736	gebrauchsfertig
PE Rabbit Anti AlphaV	Integrin alpha V	Hase IgG	EPR1 6800	Abcam	ab21184 5	1:500
PE Mouse Anti-Human CD29	Integrin beta 1	Maus IgG1, κ	MAR4	BD	555443	gebrauchsfertig
PE Mouse Anti-Human CD61	Integrin beta 3	Maus IgG1, κ	VI-PL2	BD	555754	gebrauchsfertig
PE Rat Anti-Human CD104	Integrin beta 4	Ratte IgG2b, κ	439-9B	BD	555720	gebrauchsfertig
PE Integrin β5 Antibody (F-5)	Integrin beta 5	Maus IgG2a, κ	F-5	Santa Cruz	sc-398214 PE	1:50

2.8.2 Isotypenkontrolle

Tabelle 13: Isotypenkontrolle

Bezeichnung	Klon	Hersteller	Nummer	Verdünnung
PE Mouse IgG1, K Isotype Control	MOPC-21	BD	555749	gebrauchsfertig
PE Mouse IgG2a, K Isotype Control	G155-178	BD	559319	gebrauchsfertig
PE Rat IgG2a, K Isotype Control	Clone R35-95	BD	555844	gebrauchsfertig
PE Rat IgG2b K Isotype Control	R35-38	BD	555848	gebrauchsfertig
Rabbit IgG (Phycoerythrin) - Isotype Control	Polyclonal	Abcam	ab37407	10 µl für 10 ⁶ Zellen

2.9 Blockadestudien

2.9.1 Funktionsblockierende Antikörper

Tabelle 14: Funktionsblockierende Antikörper

Name	Klon	Hersteller	Nummer	Verdünnung	Herkunft
Anti-Integrin α3	P1B5	Merck	MAB1952Z	1:100	Maus
Anti-Integrin α5	P1D6	Merck	MAB1956Z	1:100	Maus
Anti-Integrin β1	6S6	Merck	MAB2253Z	1:100	Maus
Anti-Integrin β3	B3A	Merck	MAB2023Z	1:100	Maus

2.10 Zellkultivierung

2.10.1 Verwendete Zellkulturen

Caki-1:

Metastasiertes klarzelliges NZK, Patientenisolat eines 49-jährigen kaukasischen Mannes (Abbildung 8 a). Einschichtig wachsend. Von Hippel-Lindau Wildtyp (*VHL wt*) (184). LGC Promochem (Wesel, Germany). Biologische Schutzstufe 1 (185-187).

786-O:

Nierenzell-Adenokarzinom, Patientenisolat epithelialen Ursprungs aus der Niere eines 58-jährigen kaukasischen Mannes (Abbildung 8 b). Einschichtig wachsend. *VHL*-mutiert (183). Aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DMSZ, Braunschweig). Biologische Schutzstufe 1 (185, 186).

KTCTL-26:

Klarzelliges NZK, Patientenisolat aus dem Ausgangstumor eines 69-jährigen Mannes (*VHL* nicht klar definiert) (Abbildung 8 c). Klassifikation nach TNM: T2a, Nx, M1 Grad: G2 (188, 189). Einschichtig wachsend. Aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DMSZ, Braunschweig).

A-498:

Humanes NZK. Patientenisolat aus der Niere einer 52-jährigen Mannes (Abbildung 8 d). Einschichtig wachsend. *VHL wt* (184). Cell Lines Service (Heidelberg, Germany). Biologische Schutzstufe 1 (187, 190).

Die Zelllinien wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Blaheta aus der Klinik für Urologie - Universitätsklinikum Frankfurt zur Verfügung gestellt (127, 129, 130, 191). Die Therapieresistenz gegen Sunitinib wurde durch stetige Zugabe aufsteigender Konzentrationen bis zu einer Konzentration von 1 μM (= Erhaltungsdosis) in Frankfurt und Mainz hergestellt. Die Therapieresistenz wurde durch Verschiebung des IC_{50} (= Konzentration, bei der das Wachstum im Konzentrationsbereich um 50 % reduziert ist) ermittelt. Dabei wurden die Zellen als resistent definiert, wenn der IC_{50} -Wert mindestens um die Hälfte erhöht vorlag. So lagen zu jeder NZK-Zelllinie therapiesensitive (parentale) und Sunitinib-resistente [1 μM] Zellen vor (191) (Abbildung 8).

Zur Simulation relevanter Schritte innerhalb der Metastasierung, wie der Anheftung von Tumorzellen an die vaskuläre Gefäßwand, wurden humane vaskuläre Endothelzellen (HUVEC - *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) genutzt.

Die HUVEC wurden aus der Umbilikalvene von Nabelschnüren isoliert (siehe 2.10.4) (die Nabelschnüre wurden freundlicherweise von der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit, Universitätsmedizin Mainz, zur Verfügung gestellt).

Alle verwendeten NZK-Zellen wurden am 21.09.2018 durch die Firma Multiplexion GmbH in Friedrichshafen charakterisiert. Die Identität der Zelllinie KTCTL-26 konnte auf Grund mangelnder Datenbankeinträge nur durch das Ausschlussverfahren bestätigt werden (Tabelle 15).

Tabelle 15: Zellcharakterisierung, Auszug vom 21.09.2018 der Multiplexion GmbH

Zelllinie	Identität in %	Identität bestätigt?	Genotype Code
Caki-1 (parental)	100	bestätigt	TTWTTTATATAWWTAAATTTATATTTW TAAAATTAWAATTTTWTATAA
Caki-1 (resistent)	98	bestätigt	TTATTTATATATTTAAATTTATATTTATAA AATTAATTTTATATAA
786-O (parental)	98	bestätigt	AATTTTTTATWWTATATTTATAATTTTA AAAAAAAWTTTTATATAT
786-O (resistent)	100	bestätigt	AATTTTTTATATWWTATATTTATAATTTTA AAAAAATATTTTTATATAT
KTCTL-26 (parental)			nicht in der Datenbank vorhanden
KTCTL-26 (resistent)			nicht in der Datenbank vorhanden
A-498 (parental)	100	bestätigt	TTTTATATAAATTAATTAATTTATATTTTAT TTTTATATTTTATWTAT
A-498 (resistent)	98	bestätigt	TTTTATATAAATTAATTAATTTATATTTTAT TTTTATAWTTTTATTTAT

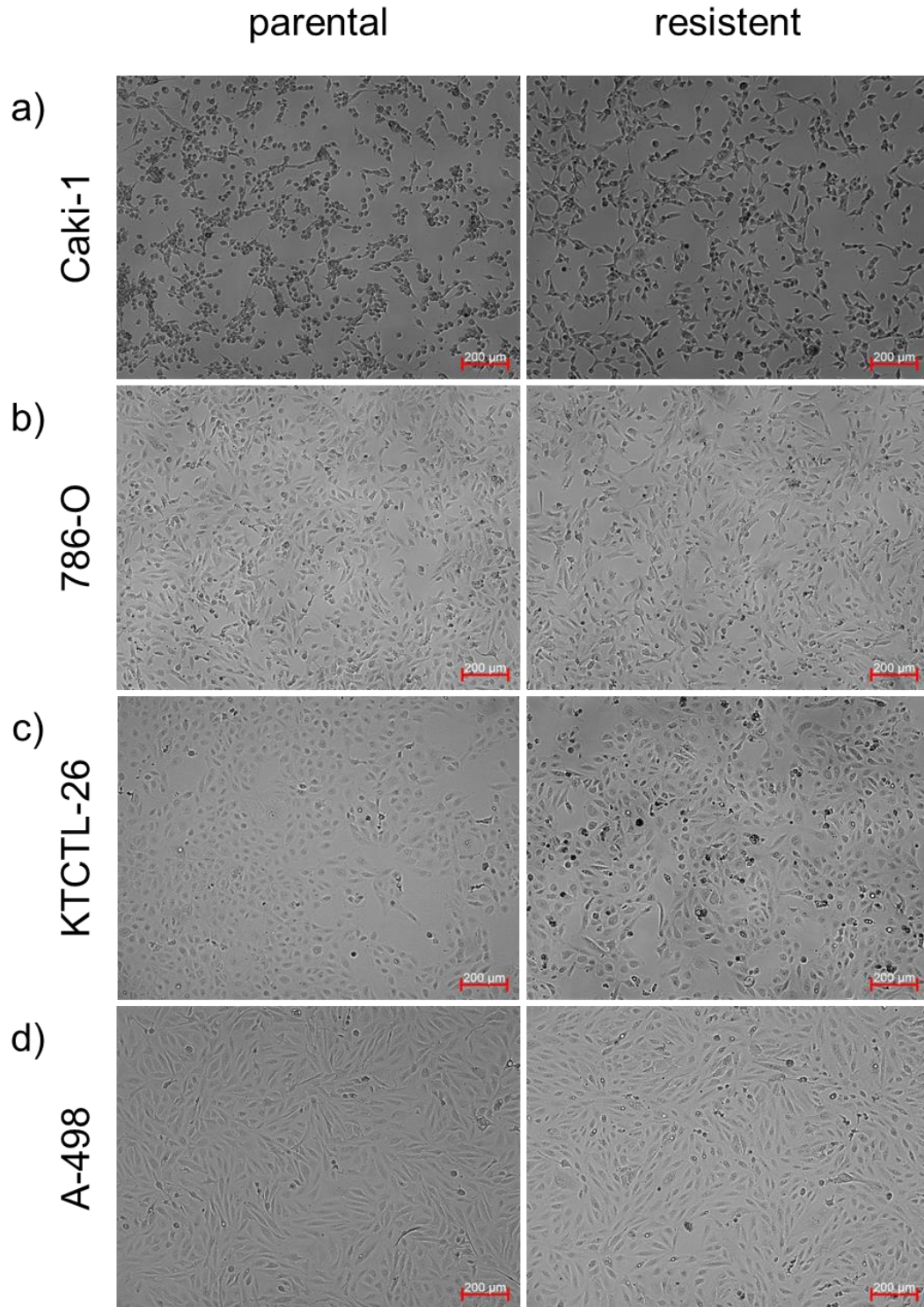


Abbildung 8: Mikroskopische Aufnahmen der verwendeten NZK-Zelllinien Linke Spalte: parentale Zellen, rechte Spalte: Sunitinib-resistente [1 μ M] NZK-Zellen. Caki-1 (a), 786-O (b), KTCTL-26 (c), A-498 (d) bei 50 x Vergrößerung.

2.10.2 Verwendete Kulturmedien

Zur Kultivierung eukaryotischer Zellen steht ein breites Spektrum an Kulturmedium zur Verfügung. Ziel ist es, eine ausreichende Versorgung mit Glucose, Salzen, Aminosäuren und Vitaminen zu gewährleisten. Drei Medien fanden in der vorliegenden Arbeit Anwendung und bildeten die Grundlage der genutzten Vollmedien.

Als Standardmedium für die Tumorzellen diente das RPMI-1640-Medium, welches mit 86 % des Gesamtvolumens die Basis des RPMI-Vollmediums darstellte. Dem Grundmedium wurden 1 % Glutamax (100 x konz.), 2 % [20 mM] HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) [1 M], 1 % Anti-Anti (100 x konz.) und 10 % fetales Rinderserum (FCS) hinzugefügt. Dieses fand Verwendung für die Zelllinien 786-O, KTCTL-26 und A-498.

Zellen mit einem erhöhten Nährstoffbedarf benötigten ein anspruchsvolleres Medium. Das ISCOVE-Basalmedium (Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)) erfüllte das Kriterium, schnellwachsende Zellkulturen ausreichend zu versorgen und bildete mit 88 % des Gesamtvolumens die Basis des ISCOVE-Vollmediums. Das Grundmedium wurde dazu mit 1 % Glutamax (100 x konz.), 1 % Anti-Anti (100 x konz.) und 10 % fetalem Rinderserum versetzt. Dieses Medium kam bei der Zelllinie Caki-1 zur Anwendung.

Um den speziellen Anforderungen von HUVEC gerecht zu werden, wurde das M199-Vollmedium angesetzt. Die Gruppe um Morgan *et al.* entwickelte das M199-Kulturmedium, das dem Anspruch primärer Zellkulturen an Vitaminen, Salzen und Aminosäuren gerecht wird (192). Das HUVEC-Vollmedium bestand aus 75 % M199-Kulturmedium, dem 20 % FCS, 0,8 % ECGS (*Endothelial Cell Growth Supplement*), 0,2 % [5.000 IE] Heparin [5000 IE/ml], 1 % [50 mg] Gentamycin [10mg/ml], 1 % Anti-Anti (100 x konz.) und 2 % [20 mM] HEPES [1 M] hinzugefügt wurden.

Therapieresistente Zellen wurden fortlaufend mit 1 μ M Sunitinib kultiviert. Dazu wurde dem entsprechenden Medium 1 μ l Stammlösung [10 mM] auf 10 ml Vollmedium hinzugefügt (Verdünnung: 1:10.000).

2.10.3 Steriles Arbeiten unter einer Sicherheitswerkbank

Alle steril auszuführenden Arbeiten wurden unter einer sterilen Sicherheitswerkbank (Herasafe™ KS) durchgeführt. Weiterhin wurden sämtliche Utensilien und Verbrauchsmaterialien mit einem Feuchttuch (Schülke wipes), das mit einem Schnelldesinfektionsmittel (Terralin® liquid) getränkt war, abgewischt. Flüssigkeiten wurden unter Vakuum mit einem Absaugsystem (VACUSAFE) und sterilen Pasteurpipetten

(Glas, 230 mm) abgenommen, in einem verschlossenen Behälter gesammelt und fachgerecht entsorgt. Nach dem Beenden der Arbeit wurde die Sicherheitswerkbank erneut ausgewischt, verschlossen und eine Stunde mit Ultraviolett (UV)-Licht bestrahlt.

2.10.4 Isolation von vaskulären Endothelzellen aus der Umbilikalvene (HUVEC)

Die Extraktion von HUVEC aus der Umbilikalvene einer Nabelschnur diente als Grundlage für die Tumorzell-Endothel-Interaktionsstudien. Mit HUVEC wurde hier das Adhäsionsverhalten von Tumorzellen mit und ohne Behandlung an vaskuläres Endothel untersucht. Zur Extraktion wurden Nabelschnüre (Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit, Universitätsmedizin Mainz) in sterile Urinbecher gegeben und in Transportmedium (98,8 % M199-Kulturmedium, 1 % Anti-Anti (100 x konz.), 0,2 % [5.000 IE] Heparin [5000 IE/ml]) bei 4 °C gelagert. Die Zellextraktion erfolgte direkt oder am Folgetag, dazu wurde unter sterilen Bedingungen das Transportmedium abgezogen, die Nabelschnur einmal mit PBS⁻ (ohne Mg²⁺ & Ca²⁺) gewaschen und in eine 15 cm Petrischale überführt. An einem Ende der Nabelschnur wurde mit einem Skalpell eine „saubere“ Schnittkante gezogen und die Kanüle (Vasofix Safety Braunüle) in das mittig liegende größte Gefäß, die Vene, eingeführt. Das Gefäß wurde anschließend mit 10 ml PBS⁻ gespült und das untere Ende mit einer Klemmschere verschlossen. 6 ml Dispase (1 U/ml in PBS⁻) wurden mit einer 10 ml Spritze aufgezogen, in die Vene injiziert und das obere Ende der Nabelschnur ebenfalls mit einer Klemmschere verschlossen. Zum enzymatischen Ablösen der Zellen erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur (RT). Nach der Inkubation wurde die untere Klemmschere über einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gelöst, dann die obere Klemmschere entfernt und die Vene einmal mit 10 ml PBS⁻ gespült. Die Lösung mit dem Zellmaterial wurde aufgefangen und anschließend für 5 min bei 1.200 rpm (*Revolutions per Minute* = Umdrehungen pro Minute) oder 500 rcf (*Relative Centrifugal Force* = relative Zentrifugalbeschleunigung) bei RT zentrifugiert (Megafuge 16R). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml M199-Vollmedium aufgenommen, in eine 25 cm² Kulturflasche für Primärzellen (Zellkulturflasche Cell+) überführt und bei 37 °C mit 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am Folgetag erfolgte ein Mediumwechsel.

2.10.5 Passagieren und Kultivieren der Zellkulturen

Die verwendeten Tumor-Zelllinien wurden in 25 cm² (T25) und 75 cm² (T75) Zellkulturflaschen kultiviert. Die Behandlung Sunitinib-resistenter Zelllinien mit 1 µM Sunitinib wurde fortgeführt, um den nötigen Resistenzdruck aufrecht zu erhalten. Dazu erfolgte im zweitägigen Abstand ein Mediumwechsel. Erreichten die Tumorzellen und HUVEC eine Konfluenz von ca. 80 %, konnten diese für einen Versuch genutzt oder weiter subkultiviert

werden. Dazu wurde das Medium abgenommen, der Zellrasen mit 5 ml PBS⁻ gewaschen und die Zellen mit 1 ml Trypsin für ca. 5 min bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Durch die enzymatische Reaktion lösten sich die Zell-Zell- und Zell-Boden-Kontakte. Anschließend wurde die Reaktion mit 9 ml Vollmedium gestoppt und das Gesamtvolumen von 10 ml, ausreichend für einen Versuchsansatz, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt oder anteilig zur Subkultivierung in neue Zellkulturflaschen gegeben. In der Regel erfolgte die Aufteilung der Tumorzellen in eine neue Zellkulturflasche je nach Bedarf 1:10 (nach 4 – 5 Tagen erneut konfluent) oder 1:5 (nach 2 – 3 Tagen erneut konfluent). HUVEC wurden jedoch maximal in einem Verhältnis von 1:3 aufgeteilt und bis höchstens zur fünften Passage kultiviert. Das Volumen wurde anschließend auf 14 ml für T75- und 6 ml für T25-Flaschen mit dem jeweiligen Kulturmedium aufgefüllt.

2.10.6 Bestimmung und Einstellung auf eine definierte Zellzahl

Zur Zellzählung wurden die Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst (siehe 2.10.5). Nachdem die Reaktion mit 9 ml Vollmedium gestoppt und das Gesamtvolumen von 10 ml in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt worden war, erfolgte die Zählung. Dafür wurden 10 µl der Zellsuspension entnommen und mit 10 µl 0,4 % Trypanblau vermischt. 10 µl dieses Gemisches wurden in ein „*Cell Counting Slide*“ pipettiert, welches im Zellzähler (LUNA™ Automated Cell Counter) ausgelesen werden konnte. Dieser gab die Zellzahl pro ml an, die dann für die Berechnung und Einstellung einer definierten Zellzahl verwendet wurde.

2.10.7 Einfrieren und Lagerung der Zellkulturen

Die Lagerung von Zellkulturen erfolgte bei -196 °C in flüssigem Stickstoff. Dazu wurde die zu konservierende Zelllinie in einer T75-Kulturflasche kultiviert und bei Konfluenz geerntet. Die Ablösung der Zellen erfolgte wie unter 2.10.5 beschrieben mit Trypsin. Nach Zugabe von 4 ml Vollmedium wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellen bei 500 rcf für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 2 ml Einfriermedium (70 % Vollmedium, 20 % FCS, 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid)) aufgenommen. 1 ml der Lösung wurde jeweils in ein Kryoröhrchen überführt und mit einer speziellen Einfrierhilfe, die ein gleichmäßiges Herunterkühlen von 1 °C pro Minute ermöglicht, über Nacht bei -80 °C gelagert. Anschließend erfolgte die Umlagerung in flüssigen Stickstoff.

2.10.8 Auftauen von kryokonservierten Zellen

Bei Bedarf wurden kryokonservierte Zellen zurück in Kultur gebracht. Dazu wurde das Kryoröhrchen dem Stickstoff entnommen und möglichst schnell aufgetaut (ca. 1 min bei

37 °C), sodass noch ein kleiner Eisrest vorhanden war. Die in Einfriermedium aufgetauten Zellen (1 ml) wurden in 13 ml vorgewärmtem Vollmedium aufgenommen und in eine T75-Kulturflasche überführt. Ein Mediumwechsel am Folgetag diente dazu, den im Medium enthaltenen DMSO-Anteil zu entfernen.

2.11 Analysen zur Bestimmung des Zellwachstums

Das Zellwachstum gibt Aufschluss darüber, inwiefern die zu untersuchenden Stoffe einen inhibitorischen Einfluss ausüben. Von Stoffen mit bisher unbekanntem Wirkspektrum empfiehlt es sich, in der entsprechenden Zelllinie Dosis-Wirkungskurven zu erstellen. Die Kombination aus metabolischer Aktivität (Viabilität) und Zellproliferation gibt dabei eine valide Aussage über das Wachstumsverhalten.

2.11.1 Bestimmung des Tumorzellwachstums – Viabilität (MTT-Test)

Das Tumorzellwachstum wurde indirekt durch die Stoffwechselaktivität metabolisch aktiver Zellen mit der 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Analyse bestimmt. Die Methode basiert auf einem von Tada *et al.* modifizierten Protokoll (193). Das gelbe Tetrazoliumsalz MTT wird verstoffwechselt und zu dem blauen wasserunlöslichen Formazan reduziert. Für die Durchführung wurden 5.000 Zellen pro Well (in Vollmedium) in eine 96-Well Mikrotiterplatte ausgesät (Dreifachansatz) und behandelt (Tabelle 16).

Tabelle 16: Zellzahlen und verwendete Konzentrationen von ART und SHI für die Bestimmung der Zellviabilität (MTT-Test)

Zelllinie	Zellzahl	ART	SHI
Caki-1	5.000	10, 20, 30, 40, 50 µM	0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 µM
786-O	5.000	10, 20, 30, 40, 50 µM	0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 µM
KTCTL-26	5.000	10, 20, 30, 40, 50 µM	0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 µM
A-498	5.000	10, 20, 30, 40, 50 µM	0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 µM

Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle und Wells nur mit Medium als Hintergrundkontrolle (*Blank*). Das Gesamtvolumen in den Wells betrug jeweils 100 µl/Well. Um eine Kinetik zu erstellen, wurden für drei Zeitpunkte (24, 48, 72 h) Platten angefertigt. Mit Standardkurven (160.000, 80.000, 40.000, 20.000, 10.000, 5.000, 2.500 Zellen) konnte der Farbumschlag aufgrund der metabolischen Aktivität in eine Zellzahl umgerechnet werden. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten (24, 48, 72 h) im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit) wurden je Well 10 µl MTT (5 g/l in PBS⁻) zur Zellsuspension hinzugeben und für weitere 4 h inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Solubilisierungspuffer (100 g/l SDS, 0,01 N HCl in Aqua dest.) abgestoppt und über Nacht bei 37 °C weiter inkubiert. Die fotometrische Messung des Farbumschlags wurde am Folgetag am Plattenlesegerät (Tecan Spark 10M) bei einer Wellenlänge von 570 nm und

einer Referenzmessung bei 700 nm mit der Software Magellan durchgeführt. Die Datenausgabe erfolgte als „optische Dichte“ (OD) oder als Zellzahl durch Verrechnung der OD-Werte mit der erstellten Standardkurve unter Abzug des Hintergrundes (*Blank*) mit der Software Magellan. Zur Normalisierung der Einzelmessung wurden aus den Triplikaten Mittelwerte gebildet und die unbehandelte Kontrolle auf 100 % gesetzt. Zur kinetischen Auswertung über drei Zeitpunkte wurde hingegen jeweils der 24 h-Messwert auf 100 % gesetzt. Zur Berechnung des IC₅₀-Wertes wurden Dosis-Wirkungskurven mit nichtlinearer Regression für jeden Zeitpunkt über einer variablen Steigung mit 4 Parametern mit der Software GraphPad geplottet. Dazu wurden die Konzentrationen des inhibierenden Stoffs auf der x-Achse logarithmisch und die Messwerte in % auf der y-Achse aufgetragen. Die Formel „ $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))}$ “ diente als Grundlage der Berechnung.

2.11.2 Bestimmung der Zellproliferation (BrdU-Test)

Die Proliferation wurde durch Interkalation von Bromdesoxyuridin (BrdU) in die DNA nachgewiesen. BrdU ist ein chemisches Analogon zum Nukleotid Thymidin und wird anstatt dessen in die DNA sich teilender Zellen eingebaut. Mit einem Antikörper gegen BrdU (Anti-BrdU) konnten im ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) so Zellen detektiert werden, die eine Zellteilung vollzogen haben. Durch einen zweiten Antikörper, Anti-BrdU, der an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP - *Horseradish Peroxidase*) gekoppelt war, kam es dabei durch Umsatz eines Substrates zum Farbumschlag, der proportional zum BrdU-Einbau (und somit der Antikörper-Bindung) ist. Für die Versuchsreihen wurden die Zelllinien, wie in Tabelle 17 aufgeführt, behandelt und eingestellt.

Tabelle 17: Zellzahlen und verwendete Konzentrationen von ART und SHI für die Bestimmung der Zellproliferation (BrdU)

Zelllinie	Zellzahl	ART	SHI
Caki-1	5.000	10, 20, 30, 40, 50 µM	0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 µM
786-O	5.000	10, 20, 30, 40, 50 µM	0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 µM
KTCTL-26	5.000	10, 20, 30, 40, 50 µM	0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 µM
A-498	5.000	10, 20, 30, 40, 50 µM	0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 µM

Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Das Gesamtvolumen betrug auch hier 100 µl/Well in einer 96-Well Mikrotiterplatte. Alle Proben wurden jeweils als Triplikate angesetzt. Als Hintergrundkontrolle wurden jeweils unbehandelte Zellen ohne BrdU sowie Wells nur mit Medium mitgeführt. Die Analyse erfolgte zu drei Zeitpunkten, 24, 48 und 72 h, mit dem BrdU Cell Proliferation Kit. Für jeden Zeitpunkt wurde ein gesonderter Ansatz ausplattiert. 24 h vor Erreichen des jeweiligen Zeitpunktes wurden 20 µl/Well BrdU in das Kulturmedium (1:2.000 Verdünnung) hinzugegeben und somit 24 h parallel zur Behandlung inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium verworfen und der Versuch gestoppt. Dann erfolgte für 30 min bei

RT die Zugabe der Denaturierungs- und Fixierlösung. Die so fixierten Zellen konnten für eine Woche bei 4 °C gelagert oder direkt gefärbt werden. Dazu wurde der Anti-BrdU Antikörper 1:100 in dem Antikörperpuffer verdünnt und die Zellen mit 100 µl/Well für 1 h bei RT inkubiert. Der nicht gebundene Antikörper und die Antikörper-Lösung wurde verworfen, die Platten auf einem Papierhandtuch vorsichtig trocken geklopft und dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen. Darauf folgte eine 30-minütige Inkubation mit je 100 µl/Well des sekundären Antikörpers (Goat Anti-Mouse IgG (HRP konjugiert), 1:1.000 verdünnt in *Conjugate Diluent*). Drei weitere Waschschrte mit Waschpuffer und ein weiterer mit Aqua dest. folgten. Die Platten wurden erneut getrocknet und für 15 min mit je 100 µl/Well Substrat-Lösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)) inkubiert. Nach 15 min wurde der Substratumsatz mit 100 µl der Stopp-Lösung beendet. Dabei erfolgt ein Farbumschlag ins Gelbe. Fotometrisch konnte der Farbumschlag mit dem Plattenlesegerät (Tecan Spark 10M) und der Software Magellan bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt werden (Referenzmessung bei 650 nm). Die Datenausgabe erfolgte in OD. Nach Verrechnung der Nullwerte (Zellen ohne BrdU, Medium ohne Zellen + BrdU) wurden die Mittelwerte der Triplikate (technischen Replikate) für die weitere Berechnung verwendet. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen auf 100 % gesetzt und die übrigen Probenwerte darauf normalisiert.

2.11.3 Bestimmung des klonogenen Potenzials – klonogenes Wachstum

Mit dem klonogenen Wachstumstest können sowohl Aussagen über die Proliferation von Zellen als auch das Potenzial von Einzelzellen, in neuen Organen zu Metastasen heranzuwachsen, getroffen werden. Die vereinzelt Zellen wurden dazu zehn Tage in einer Zellkultur-Multititerplatte (6-Well) mit einem Gesamtvolumen von 5 ml Nährmedium (mit oder ohne Behandlung) inkubiert (siehe Tabelle 18) (37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrollen.

Tabelle 18: Zellzahlen und Konzentrationen von ART und SHI für die Behandlung des klonogenes Wachstums

Zelllinie	Zellzahl	ART	SHI
Caki-1	500	10, 20, 30, 40, 50 µM	0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 µM
786-O	500	10, 20, 30, 40, 50 µM	0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 µM
KTCTL-26	500	10, 20, 30, 40, 50 µM	0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 µM
A-498	500	10, 20, 30, 40, 50 µM	0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 µM

Durch Entfernung des Mediums erfolgte der Versuchsstopp. Durch zweimaliges Waschen mit PBS⁺ (+ Mg²⁺ und Ca²⁺) wurden die toten Zellen und Zellreste entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Methanol-Essigsäure-Lösung (85 % MeOH + 15 % AcOH) für 5 min fixiert. Die Kolonien konnten so direkt - oder nach vorheriger Färbung - am Mikroskop

gezählt werden. Für die Färbung wurden die Zellen mit 2 ml einer Coomassie-Färbelösung für 30 min bei RT inkubiert.

Coomassie-Färbelösung:	0,5 g	Coomassie-Brillant-Blau G-250
	75 ml	100 % Essigsäure
	200 ml	Methanol
	725 ml	Aqua dest.

Anschließend wurde bis zur vollständigen Hintergrundfärbung mit Aqua dest. gespült. Coomassie wird im Nah-Infrarotbereich angeregt. Die Messung erfolgte daher mit dem Sapphire Biomolecular Imager und der Software AzureCapture im Kanal 784/832BP32, einer Laser Intensität von 10 und einer Pixelgröße von 50 μm . Zur Auswertung wurden die Bilder in das Programm ImageJ geladen. Das Areal und die Anzahl der Kolonien wurde durch die Funktion „*Analyse Particles*“ bestimmt. Die Mindestgröße der zu berücksichtigenden Fläche wurde auf 50,8 μm^2 (entspricht 50 Zellen) eingestellt, damit nur Kolonien ab einer Größe von 50 Zellen in die Berechnung eingeschlossen wurden. Da die Bildgröße in Pixeln nicht variierte, bzw. mit dem gleichen Raster gescannt wurde, konnten die definierten Werte auf jede Messreihe übertragen werden. So wurden die Kolonienanzahl, die mittlere Größe der Kolonien und die bewachsene Fläche berechnet. Die unbehandelten Kontrollen wurden auf 100 % gesetzt und alle anderen Probenwerte darauf normalisiert.

2.11.4 Resistenznachweis (Sunitinib)

Der Sunitinib-Resistenznachweis der Zelllinien Caki-1, 786-O, KTCTL-26 und A-498 erfolgte mit dem MTT-Test (2.11.1). Dazu wurden jeweils 5.000 parentale oder potenziell Sunitinib-resistente Zellen für 72 h mit aufsteigenden Konzentrationen von Sunitinib [0,1 – 100 μM] behandelt. Es wurde dann, wie unter 2.11.1 beschrieben, der IC_{50} -Wert für die parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen berechnet. Eine Verschiebung des IC_{50} -Wertes um mindestens das Doppelte wurde als Resistenz gewertet.

2.12 Zellzyklusanalysen mittels Durchflusszytometrie

Eukaryotische Zellen durchlaufen in der Zellteilung mehrere strikt gegliederte Phasen, die G0/G1-, die S- und die G2/M-Phase. In den verschiedenen Abschnitten unterscheidet sich der DNA-Gehalt. Die Veränderungen des DNA-Gehaltes können daher als Indikator für die verschiedenen Zellzyklusphasen genutzt werden. In der G0/G1-Phase weist die Zelle dabei einen einfachen Chromosomensatz auf. In der Synthesephase oder S-Phase wird die DNA repliziert. In der G2/M-Phase ist ein doppelter Satz Schwesterchromatide vorhanden und die Zelle bereit zur Teilung. Propidium-Iodid (PI) als DNA-bindender, fluorochromer Farbstoff kann zur Quantifizierung verwendet werden. Die Signalintensität steigt entsprechend proportional zum DNA-Gehalt, so weist die G2/M-Phase eine doppelte Signalstärke im Vergleich zur G0/G1-Phase auf (194). Für den Versuch wurden Zellen in T75-Kulturflaschen ausgesät und behandelt. Dabei wurden Sunitinib-resistente Zelllinien weiterhin mit 1 μ M Sunitinib fortbehandelt und jeweils parentale bzw. Sunitinib-resistente Zellen mit 1,5 μ M SHI oder 20 μ M ART inkubiert (37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Nach 48 h wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS⁻ gewaschen und enzymatisch mit Trypsin abgelöst. Zur Zentrifugation bei 500 rcf und 4 °C wurde das Zellmaterial mit 5 ml FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*)-Puffer (5 g/l BSA in PBS⁻) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, anschließend der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit 300 μ l PBS⁻ in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Ab diesem Zeitpunkt wurde auf Eis (4 °C) weitergearbeitet. Unter Schütteln (ThermoCell MixingBlock) erfolgte die Zellkernextraktion und Fixierung durch das tropfenweise Zugabe von 700 μ l EtOH (100 %) (-20 °C) mit darauffolgender dreißigminütiger Inkubation (4 °C). Anschließend konnte der Versuch fortgesetzt oder die fixierten Zellen zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert werden. Da PI auch an RNA bindet, war diese vorher zu entfernen, um Störsignale zu verhindern. Da das Entfernen vom EtOH dafür essenziell ist, erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 1.000 rcf für 5 min (Mikrozentrifuge). Der Überstand wurde restlos verworfen und 100 μ l RNase A (100 μ g/ml in PBS⁻) hinzugeben, resuspendiert und für 1 h bei 37 °C verdaut. Danach konnten die extrahierten Zellkerne mit 200 μ l PI (50 μ g/ml in PBS⁻) gefärbt werden. Die Lösung wurde anschließend in ein FACS-Röhrchen überführt und ggf. mit FACS-Puffer verdünnt. Die Messung von jeweils 10.000 Zellen erfolgte im Durchflusszytometer mit der Software FACSDiva (BD Fortessa X-20) oder CellQuest (BD FACSCalibur). Als Farbkanäle wurden bei dem BD Fortessa X-20 Phycoerythrin (PE) (gelb 585/15 nm) und beim BD FACSCalibur FL2 (gelb 585/42 nm) gewählt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ModFit LT 5.0. Die Phasen der unbehandelten Kontrollen wurden dabei jeweils auf 100 % gesetzt und die anderen Probenwerte darauf normalisiert.

2.13 Quantifizierung von apoptotischen und nekrotischen Zellen mit der Durchflusszytometrie

Die Detektion apoptotischer und nekrotischer Ereignisse erfolgte mit dem Durchflusszytometer und dem FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I von BD Pharmingen. Das Kit basiert auf zwei Reaktionen: 1.) auf der Interkalierung des Farbstoffes PI in die DNA von Zellen mit defekter Membran und 2.) der Bindung von Annexin V an das Phosphatidylserin (Apoptosemarker) an der Außenseite der Membran apoptotischer Zellen (195). Die Messung von PI als Fluorochrom erfolgt direkt. Die Annexin V-Bindung ist an den Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt (196). Frühapoptotische Zellen sind dabei nur Annexin V positiv, spätapoptotische Annexin V + PI positiv und nekrotische allein PI positiv. Vitale Zellen sind hingegen doppelt negativ (197). Für den Versuch wurden die Zellen in T75-Kulturflaschen ausgesät und behandelt. Dabei wurden Sunitinib-resistente Zelllinien weiterhin mit 1 µM Sunitinib behandelt und jeweils parentale und Sunitinib-resistente Zellen mit 20 µM ART oder 1,5 µM SHI inkubiert (37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Nach 48 h wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS⁻ gewaschen, enzymatisch mit Trypsin abgelöst, das Trypsin mit Vollmedium abgestoppt, in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und gezählt. Ab diesem Punkt wurde auf Eis weitergearbeitet. Um 1 x 10⁶ Zellen zu erhalten, wurde das entsprechende Volumen der Zellsuspension in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min mit 500 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml Bindepuffer aufgenommen. 100 µl, also 100.000 Zellen, wurden anschließend in Rundboden-Röhrchen nach dem in Tabelle 19 dargestellten Behandlungsschema aufgeteilt und die Zellen mit 5 µl der jeweiligen Färbung für 15 min im Dunkeln inkubiert (RT).

Tabelle 19: Färbung Apoptose / Durchflusszytometrie

Probe 1	PI	FITC Annexin V
Ungefärbte Kontrolle		
Kontrolle PI-Färbung	X	
Kontrolle FITC Annexin V-Färbung		X
Messprobe	X	X

Danach erfolgte die Zugabe von weiteren 400 µl Bindepuffer. Die Zellen standen dann für die Messung im Durchflusszytometer zur Verfügung. Die Proben waren für max. 1 h stabil. Die Messung von jeweils 10.000 Zellen erfolgte im Durchflusszytometer mit der Software FACSDiva (BD Fortessa X-20) oder CellQuest (BD FACSCalibur). Folgende Parameter wurden dabei für das BD FACSCalibur gewählt: FITC Annexin V - Fluoreszenz-Kanal 1 (FL1) (530/30 nm) und PI - FL2 (585/42 nm). Die Kompensation im FL2 betrug 85 %. Die Messung am BD Fortessa X-20 erfolgte für FITC Annexin V im FITC-Kanal

(blau 530/30 nm - 505 Long Pass Filter LP) und für PI im PE-Kanal (Phycoerythrin) (gelb 585/15 nm). Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FlowJo. Der prozentuale Anteil PI- und Annexin V-positiver Zellen wurden dabei in Relation zur unbehandelten Kontrolle (100 %) gesetzt.

2.14 Nachweis nekroptotischer Ereignisse nach SHI-Behandlung

Die Nekroptose ist eine regulierte Zelltodform, die Elemente der Apoptose und Nekrose enthält. Der Nachweis nekroptotischer Ereignisse nach einer SHI-Behandlung erfolgte indirekt über die Zellviabilität (MTT-Test; 2.11.1) nach additiver Zugabe des Nekroptose-Inhibitors Necrostatin-1.

5.000 Zellen wurden je Well in einer 96-Well Mikrotiterplatte ausgesät und mit entsprechenden SHI-Konzentration (0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 μM) im Triplet, behandelt. Eine kinetische Darstellung erfolgte über die drei Zeitpunkte 24, 48 und 72 h. Parallel dazu wurde ein weiterer Ansatz mit 80 μM Necrostatin-1 zur jeweiligen SHI-Konzentration angesetzt (Tabelle 20). Um den Resistenzdruck in den Sunitinib-resistenten Zellen zu erhalten, wurde hier zusätzlich Sunitinib [1 μM] verabreicht. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Diese wurden auf 100 % gesetzt und die übrigen Probenwerte darauf normalisiert.

Tabelle 20: Behandlungen für den Nekroptose-Nachweis

Behandlung	Ansatz 1	Ansatz 2
0,5 μM SHI	+ 80 μM Necrostatin-1	+ Vollmedium
1,0 μM SHI	+ 80 μM Necrostatin-1	+ Vollmedium
1,5 μM SHI	+ 80 μM Necrostatin-1	+ Vollmedium
2,0 μM SHI	+ 80 μM Necrostatin-1	+ Vollmedium
2,5 μM SHI	+ 80 μM Necrostatin-1	+ Vollmedium

2.15 Bestimmung ferroptotischer Ereignisse nach ART-Behandlung

Eine weitere Form des regulierten Zelltods stellt die Ferroptose dar. Im Unterschied zur Apoptose ist bei diesem Zelltod die Anwesenheit von Eisen essenziell und namensgebend. Charakteristisch für die Ferroptose ist eine Lipidperoxidation der Zellmembran, welche von Stoffen, die mit Eisen reagieren und dadurch ROS induzieren, ausgelöst werden kann.

Nach Eling *et al.* (153) sollte in den Versuchsansätzen:

1. durch einen spezifischen Ferroptose-Inhibitor, das Ferrostatin-1, die Lipidperoxidation und somit der Zelltod verhindert (Tabelle 21 Set 1),
2. der Effekt durch das eisenbindende Protein holo-Transferrin stimuliert (Tabelle 21 Set 2) und
3. ROS durch das Antioxidans Trolox entzogen werden (Tabelle 21 Set 3).

Die Auswirkung der Ferroptose auf die Proliferation wurde mit dem BrdU-Test ermittelt, siehe 2.11.2. Jede Behandlung erfolgte im Dreifachansatz mit je 5.000 Zellen pro Well in einer 96-Well Mikrotiterplatte. Die Behandlung erfolgte entsprechend Tabelle 21. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Sunitinib-resistente Zellen wurden dabei fortlaufend mit 1 μM Sunitinib weiterbehandelt.

Tabelle 21: Behandlungen zur Bestimmung der Ferroptose mittels BrdU

Behandlung	Ansatz 1	Ansatz 2
SET 1		
20 μM ART	+ 20 μM Ferrostatin-1	+ Vollmedium
50 μM ART	+ 20 μM Ferrostatin-1	+ Vollmedium
100 μM ART	+ 20 μM Ferrostatin-1	+ Vollmedium
SET 2		
20 μM ART	+ 20 $\mu\text{g/ml}$ holo-Transferrin	+ Vollmedium
50 μM ART	+ 20 $\mu\text{g/ml}$ holo-Transferrin	+ Vollmedium
100 μM ART	+ 20 $\mu\text{g/ml}$ holo-Transferrin	+ Vollmedium
SET 3		
20 μM ART	+ 0,5 mM Trolox	+ Vollmedium
50 μM ART	+ 0,5 mM Trolox	+ Vollmedium
100 μM ART	+ 0,5 mM Trolox	+ Vollmedium

2.15.1 Quantifizierung reaktiven Sauerstoffs mit dem GSH-Test

GSH zählt zu den stärksten Antioxidantien in eukaryotischen Zellen. In Gegenwart von ROS liegt GSH in seiner oxidierten Form (GSSG) vor. Eine Reduktion von GSH ist daher ein Indikator für die Anwesenheit von ROS. Das verwendete Kit von Promega GSH-Glo basiert auf der Umwandlung eines Luciferin-Derivats in Luciferin in Gegenwart von GSH, katalysiert durch die Glutathion-S-Transferase (GST). Die mit der Luciferase gekoppelte Reaktion resultiert in einem Lumineszenzsignal, dieses ist proportional zum GSH-Gehalt der Probe.

Für die Versuche wurden je Well 5.000 Zellen in 50 µl Medium in einer für Chemilumineszenz-Messungen geeigneten weißen 96-Well Mikrotiterplatte im Dreifachansatz ausgesät und mit 50 µM ART behandelt. Nach 24 h Inkubation (37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit) wurde das Medium verworfen und 100 µl GSH-Glo-Reagenz (1 µl 100 x Luciferin-NT + 1 µl 100 x Glutathione S-Transferase + 98 µl GSH-Glo-Reaktionspuffer) hinzugefügt und für weitere 30 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl Luciferin-Nachweisreagenz für 15 min. Danach konnte die Lumineszenz mit dem Plattenlesegerät (Tecan Spark 10M) ermittelt werden (Messung von oben). Das Signal konnte anhand einer linearen Standardgeraden verrechnet und die GSH-Konzentration mit der Software Magellan bestimmt werden. Die Normalisierung der Daten erfolgte jeweils zur unbehandelten Kontrolle, die auf 100 % gesetzt wurde.

2.16 Quantifizierung der Proteinexpression mittels Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Methode setzt sich aus verschiedenen Arbeitsabschnitten zusammen. Dazu wurden die Zellen über ein bis zwei Tage mit ART [20, 50 µM] oder SHI [0,5, 1,0, 1,5 µM] behandelt. Danach erfolgte die Proteinextraktion.

2.16.1 Proteinextraktion aus Zellkulturen und Bestimmung des Proteingehalts

Zur Quantifizierung einzelner Proteine erfolgte zunächst eine Extraktion der Proteine (hier Gesamtproteom). Um ein von enzymatischen Prozessen möglichst unbeeinflusstes Bild zu erhalten, erfolgten die Arbeiten auf Eis. Die Zellen wurden subkonfluent aus T75-Flaschen geerntet. Das Medium wurde dazu verworfen und 1 ml kaltes PBS⁻ auf den Zellrasen gegeben. Mit einem Zellschaber konnten die Zellen gelöst, mit einer 1.000 µl Pipette (Finnpipette F2) aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Anschließend erfolgte die Zentrifugation in der Mikrozentrifuge (Hereaus Fresco 21) bei 500 rcf und 4 °C für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet je nach Größe mit 100 – 200 µl Extraktionspuffer für 30 min unter Schwenken im ThermoCell MixingBlock bei 4 °C bei einer Vibrations-Geschwindigkeit von 1.500 inkubiert.

Extraktionspuffer:	950 µl	RIPA-Puffer (1 x)
	10 µl	DTT (0,5 mM)
	10 µl	Protease Inhibitor Cocktail
	10 µl	Phosphatase Inhibitor Cocktail 2
	10 µl	PMSF (100 mM)
	10 µl	Triton X-100
RIPA-Puffer:	50 mM	Tris-HCL pH 7,4 (25 ml von 1 M Stammlösung)
	5 ml	NP-40
	2,5 g	Na-deoxycholate
	0,5 g	SDS
	150 mM	NaCl (15 ml von 5 M Stammlösung)
	2 mM	EDTA (2 ml von 0,5 M Stammlösung)
	auf 500 ml Aqua dest. auffüllen	

Das Entfernen der übrigen Zellbestandteile erfolgte durch Zentrifugation für 10 min bei 21.000 rcf und 4 °C. Die gelösten Proteine befanden sich danach im Überstand, der in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt wurde und bei -80 °C gelagert oder direkt weiterverwendet werden konnte.

Für die Proteinbestimmung nach Bradford (198) wurden 45 µl PBS⁻ in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und 5 µl des Proteinlysats hinzugegeben (1:10 verdünnt). Die Quantifizierung erfolgte mit einer Standardreihe (BSA in PBS⁻: 100, 200, 400, 800, 1.000 ng/µl). Die Proben und Standards wurden im Dreifachansatz mit je 10 µl in eine 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert und jeweils 300 µl der 1 x Bradfordreagenz hinzugegeben.

5 x Bradfordreagenz: 300 mg Coomassie-Brillant-Blau G-250
 150 ml Methanol
 150 ml Aqua dest.
 300 ml 85 % Phosphorsäure
Coomassie in 150 ml Methanol lösen, Phosphorsäure hinzugeben und mixen. Mit Aqua dest. auffüllen, anschließend filtrieren und bei 4 °C im Dunkeln lagern.

Coomassie-Brillant-Blau G-250 (Absorptionsmaximum der ungebundenen roten Form bei 470 nm) komplexiert mit Aminosäuren im Proteinlysate, wodurch eine Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 595 nm (blau) erfolgt. Die Intensität korreliert mit der Menge an vorhandenen Aminosäuren. Die OD bei 595 nm wurde mit dem Plattenlesegerät (Tecan Spark 10M) und der Software Magellan ermittelt. Die Konzentration wurde anschließend anhand der Standardkurve durch lineare Regression $f(x)$ berechnet.

2.16.2 Probenvorbereitung für die SDS-Gelelektrophorese

Ein komplexes Proteinlysate ist zur Detektion von Proteinmengen einzelner Proteine ungeeignet. Die Auftrennung über ein SDS-Gel nach Laemmli (199), in dem die Eigenladung negativ überdeckt wird und lediglich die Proteingröße Beachtung findet, wurde daher verwendet. Der Anteil an Polyacrylamid bestimmt dabei die Porengröße und das Auftrennungsmuster. Kleine Proteine erfordern eine höhere Konzentration, größere hingegen eine geringere, um im Gel gut aufgetrennt zu werden. Die SDS-überlagerten Proteine mit negativer Ladung wandern im angelegten Gleichstrom Richtung Plus-Pol (Anode). Für die Versuchsdurchführung wurde die zuvor bestimmte Konzentration des Proteinlysats auf 50 µg Protein pro 20 µl eingestellt. Miteinbezogen in das Volumen wurde der 6 x konzentrierte Probenpuffer, der anschließend 1-fach vorlag (3,33 µl auf 20 µl Gesamtvolumen).

6 x Probenpuffer	350 mM	Tris-HCl pH 6,8 (10 ml von 3,5 M Stammlösung)
	34,4 ml	Glycerol
	10 g	SDS
	10 ml	Mercaptoethanol
	60 mg	Bromphenolblau
	auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen	

Volumendifferenzen wurden mit Aqua dest. ausgeglichen. Die mit Probenpuffer versetzten Proben wurden dann für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Denaturierung der Proteine verhindert konformationsbasierte Einflüsse im Auftrennungslauf.

2.16.3 SDS-Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden 1,5 mm Mini SDS-Laufgele hergestellt (Bio-Rad). Eine Glasplatte mit 1,5 mm Abstandshalter (*Spacer Plate*) wurde mit einer Deck-Glasplatte (*Short Plate*) in einen Gelgießrahmen eingespannt und auf dem Gelgießstand arretiert. Das Trenngel wurde entsprechend der zu detektierenden Proteingröße gewählt (Tabelle 22). 7,5 ml des hergestellten Trenngels wurde zwischen den Glasplatten eingefüllt und mit 0,5 ml 100 % Isopropanol bedeckt. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol verworfen und das Trenngel mit Aqua dest. gespült. Abschließend wurden die Glasplatten mit 2,5 ml Sammelgel aufgefüllt und mit einem 15er Taschenkamm zur Formung der Ladetaschen versehen. Nach der Polymerisation standen diese zur Gelelektrophorese bereit oder konnten eingewickelt in angefeuchteten Tüchern in einem Plastikbeutel 2 Tage bei 4 °C aufbewahrt werden.

Tabelle 22: Rezepturen SDS-Gele

1 Gel	Sammelgel 4 %	Trenngel 7 %	Trenngel 10 %	Trenngel 12 %
Aqua dest.	5,4 ml	3,9 ml	2,6 ml	1,75 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Sammelgelpuffer	2,5 ml	-	-	-
Trenngelpuffer	-	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Acrylamid A	1,3 ml	2,3 ml	3,2 ml	3,9 ml
Bisacryl B	0,6 ml	1,1 ml	1,6 ml	1,8 ml
10 % APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	20 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Sammelgelpuffer 68,1 g Tris
 400 ml Aqua dest.
 pH-Wert auf 6,8 mit HCl einstellen
 mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen

Trenngelpuffer 68,1 g Tris
 400 ml Aqua dest.
 pH-Wert auf 8,8 mit HCl einstellen
 mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen

Als Größenstandard wurde eine Ladetasche mit 5 µl des Größenstandards (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™) beladen und mit 15 µl 1 x Probenpuffer aufgefüllt. Alle weiteren Taschen wurden mit je 50 µg Probe beladen und die Elektrophoresekammer mit 1 x SDS-Laufpuffer aufgefüllt.

SDS-Laufpuffer (1 x) 100 ml Rotiphorese® 10 x SDS-PAGE
 900 ml Aqua dest.

Zunächst wurde eine Spannung von 80 V angelegt, bis die Lauffront die Grenze zum Trenngel passierte. Anschließend wurde die Spannung auf 120 – 150 V erhöht (PowerPac™ Basic Power Supply). Die Gelelektrophorese wurde gestoppt, nachdem die Lauffront am unteren Ende des Gels angelangt war.

2.16.4 Proteintransfer auf eine Trägermembran - Blotvorgang

Die quantitative Analyse einzelner Proteine erfolgte antikörperbasiert mit dem 1979 entwickelten Western-Blot-Verfahren (200, 201). Dazu mussten die nach Größe aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran, mit einer Porengröße von 0,2 µm, übertragen (geblottet) werden. Hierzu wurden die Gele aus der Halterung entnommen, die Glasplatten und das Sammelgel entfernt und das SDS-Gel im 1 x Transfer-Puffer gewaschen. Bevor die PVDF-Membran für den Blotvorgang genutzt werden konnte, wurde diese für 5 min in Methanol aktiviert. Außerdem mussten insgesamt je Gel acht Filterpapiere zurechtgeschnitten werden. Diese wurden zusammen mit je zwei Schwämmen mit 1 x Transfer-Puffer durchfeuchtet.

10 x Transfer-Puffer	30,3 g	Tris
	144,1 g	Glycin
	mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen	
1 x Transfer-Puffer	100 ml	10 x Transfer-Puffer
	200 ml	Methanol
	700 ml	Aqua dest.

Die Übertragung der Proteine folgte dem Aufbau aus Abbildung 9. Eine Kassette wurde mit der schwarzen Färbung nach unten positioniert. Auf den schwarzen Bereich der Blot-Vorrichtung/Kassette wurden anschließend ein Schwamm und vier Filterpapiere sowie das Gel gelegt. Darauf wurde die PVDF-Membran positioniert. Mit einem Roller wurden dabei die Luftblasen zwischen Gel und Membran entfernt.

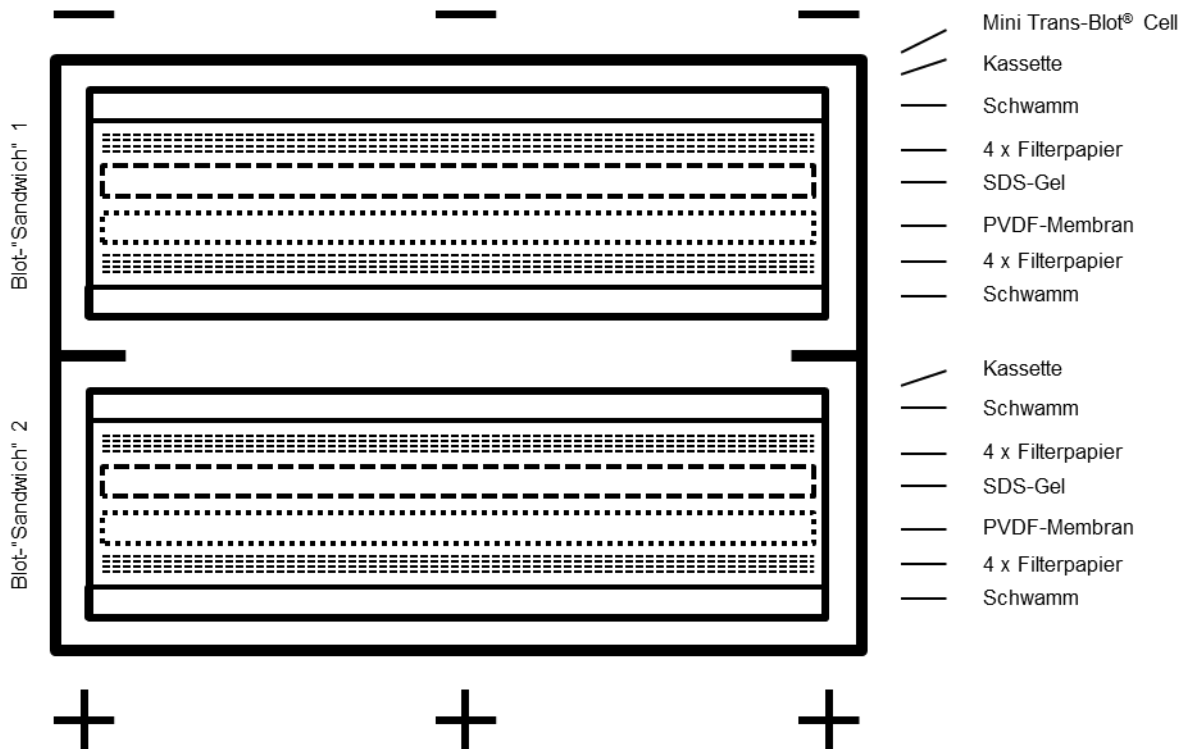


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Western-Blot-, 'Sandwich'-Aufbaus.

Abschließend wurde die Membran mit vier Filterpapieren bedeckt und erneut potenzielle Luftblasen entfernt. Mit einem weiteren Schwamm konnte die Kasette geschlossen und in die dafür vorgesehene Halterung in der Mini Trans-Blot® Cell eingeschoben werden. Dabei war die Polung der Kasette zu beachten, schwarz zu schwarz für die Kathode, transparent für die Anode. Zur Kühlung wurde ein Kühl-Akku hinzugegeben und die Kammer bis zur Markierung mit 1 x Transfer-Puffer aufgefüllt. Der Blotvorgang erfolgte für 1 h bei 100 V mit variabler Stromstärke am geregelten Gleichstromnetzteil (PowerPac™ HC Power Supply). Nach dem Blotvorgang wurden die Kassetten geöffnet, die PVDF-Membran in eine Inkubationsschale (Emsa Clip & Close Frischhaltedosen 0,55 l) überführt und in dieser für 10 min in 10 ml TBS-T gewaschen.

TBS (10 x)	4,24 g	Tris
	26 g	Tris HCl
	292,7 g	NaCl
	950 ml	Aqua dest. lösen
		pH-Wert auf 7,4 mit HCl einstellen
		mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen

TBS (1 x)	100 ml	TBS (10 x)
	900 ml	Aqua dest.

Material und Methoden

TBS-T	999 ml	TBS (1 x)
	1 ml	Tween20

Der Puffer wurde verworfen und 10 ml Blockierlösung (5 g Milchpulver in 50 ml 1 x TBS) hinzugegeben. Die Blockade erfolgte für 1 h unter langsamem Schwenken bei RT. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C. Dazu wurde die Blockierlösung verworfen und 10 ml Antikörperpuffer (2,5 g BSA in 50 ml TBS-T) mit dem Antikörper versetzt. Die Antikörperverdünnung wurde dabei nach der unter 2.7 aufgeführten Liste (Tabelle 8, Tabelle 9, Tabelle 10) durchgeführt. Am Folgetag wurde der Antikörperlösung entweder verworfen oder zur erneuten Verwendung eingefroren. Die Membran wurde daraufhin 3 x für 10 min mit TBS-T gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem *Horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelten sekundären Antikörper gegen die Spezies des ersten primären Antikörpers für 1 h bei RT (siehe 2.7.4, Tabelle 11). Drei weitere Waschschriffe für 10 min mit TBS-T folgten. Die Membran wurde mit 2 ml ECL (Chemilumineszenz)-Lösung (Radiance Plus ECL Lösung) für 2 min inkubiert. Anschließend wurde die Chemilumineszenz mit dem Sapphire Biomolecular Imager detektiert und eine Lichtbildaufnahme getätigt. Die Normalisierung des Probenauftrags erfolgte entweder gegen ein Haushalts-Protein (β -Aktin, GAPDH) (siehe 2.7.3, Tabelle 10) oder gegen das Gesamtprotein. Für letzteres wurde die Membran in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 2 ml Coomassie-Färbelösung für 30 min gefärbt.

Coomassie-Färbelösung	500 ml	Methanol
	100 ml	100 % Essigsäure
	400 ml	Aqua dest.
	2,5 g	Coomassie-Brillant-Blau R-250

Anschließend wurde der Hintergrund der Membran mit 10 ml Coomassie-Entfärbelösung entfernt. Die irreversible Färbung/Bindung zwischen Protein und Coomassie blieb dabei erhalten.

Coomassie-Entfärbelösung	875 ml	Aqua dest.
	50 ml	Methanol
	75 ml	100 % Essigsäure

Der Entfärbeporgang erfolgte über 24 h oder bis zum gewünschten Level unter mehrmaligen Wechsel der Coomassie-Entfärbelösung. Vor der Lichtbildaufnahme im Sapphire Biomolecular Imager wurde die Membran getrocknet. Die Pixelanalyse der Banden und die

Bestimmung der Gesamtproteinmenge der Coomassiefärbung wurden mit dem Programm AlphaView durchgeführt. Zur Normalisierung wurden die Werte des zu detektierenden Proteins durch das Standardprotein oder durch das Gesamtprotein geteilt. Die Resultate wurden wiederum in Bezug zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle gesetzt, die ihrerseits auf 100 % gesetzt wurde.

2.17 Bestimmung der Adhäsion von NZK-Zellen an extrazelluläre Matrixproteine (EZM-Proteine)

Das Adhäsionspotenzial von Tumorzellen ist maßgeblich in die Entstehung neuer Metastasen involviert. Eine Veränderung der Adhäsionseigenschaften von NZK-Zellen durch ART und SHI wurde an speziell beschichteten Multiwellplatten untersucht. Kollagene, als Strukturproteine des Bindegewebes, und Fibronectin repräsentierten die EZM. Eine Beschichtung mit HUVEC hingegen repräsentierte vaskuläres Endothel. Für die Versuche wurden die Tumorzellen über drei Tage mit 20 µM ART oder 1 µM SHI vorbehandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Am Vortag wurden 24-Well Multititerplatten mit EZM-Proteinen beschichtet. Jeweils für einen Dreifachansatz erfolgte die Beschichtung mit 1 ml Kollagen [200 µg/ml] und Fibronectin [10 µg/ml]. Drei weitere Wells wurden nur mit PBS⁻ befüllt und dienten als Kontrolle für die unspezifische Bindung an Plastik. Die Anzahl an Platten musste entsprechend der Versuchsgröße angepasst werden. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Am Versuchstag wurden die Platten dreimal mit PBS⁻ gewaschen und anschließend mit 500 µl Blockierlösung (5 g/l BSA in PBS⁻) für 1 h blockiert. In der Zwischenzeit konnten die Zellen abgelöst, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 500 rcf für 5 min zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen auf 1 x 10⁶ pro ml in serumfreies Medium aufgenommen. Die Färbung der Zellen mit dem Farbstoff „Cell Tracker Green“ (5-Chlormethylfluoresceindiacetat (CMFDA)) erfolgte durch Zugabe von 4 µl [1 mM in DMSO] pro ml, so dass die Endkonzentration 4 µM entsprach. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. In der Zwischenzeit konnte mit der Vorbereitung der blockierten 24-Well Multititerplatten begonnen werden. Die Blockierlösung wurde verworfen und die Platten erneut dreimal mit 1 ml PBS⁻ gewaschen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der nun gefärbten Zellen für 5 min (500 rcf). Diese wurden dann in Vollmedium aufgenommen und auf 125.000 Zellen/ml eingestellt (2.10.6). In jedes Well wurde 1 ml der Zellsuspension gegeben und für 1 h inkubiert (37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit). Nach einer Stunde wurde das Medium verworfen und die adhärennten Zellen vorsichtig dreimal mit 500 µl PBS⁺ gewaschen, um nicht-gebundene Zellen zu entfernen. Anschließend erfolgte die Fixierung mit je 1 ml 2 %iger Glutaraldehyd-Lösung (40 ml 25 % Glutaraldehyd in 460 ml PBS⁻) für 10 min. Nach einem weiteren Waschschrift mit 500 µl PBS⁻ konnten die Platten getrocknet und gemessen werden. Die Messung zur

Fluoreszenzquantifizierung erfolgte mit dem Sapphire Biomolecular Imager und der Software AzureCapture mit dem 488 nm Laserfarbkanal, einem Pixelraster von 100 μm und einer Fokusebene von 1,5 mm. Die Laserintensität betrug 7 auf einer Skala von 1 – 10, wobei 10 der maximalen Intensität entsprach. Ggf. musste dieser Wert, um eine Signalsättigung zu vermeiden angepasst werden. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm AzureSpot. Das Mitführen von entsprechenden Kontrollen und eine anschließende Normalisierung auf die unbehandelte Kontrolle in Prozent sollten Differenzen, die auf unterschiedliche Laserintensitäten zurückzuführen sind, ausgleichen.

2.18 Messung des Adhäsionsverhaltens von NZK-Zellen an HUVEC

Der Versuchsaufbau der Adhäsion an HUVEC ist ähnlich der Adhäsion von Tumorzellen an EZM-Proteine (siehe 2.17). Das Modell unterscheidet sich jedoch dahingehend, dass keine EZM-Proteine aufgetragen wurden, sondern ein konfluenten Zellrasen aus HUVEC ausgesät wurde. Die Vorbereitung erfolgte ebenfalls in 24-Well Multititerplatten. Diese wurden dazu für 1 h mit jeweils 1 ml pro Well mit einer Kollagen-Matrix beschichtet (200 $\mu\text{g/ml}$ in PBS⁻). Zeitgleich wurden adhärenz- und kultivierte HUVEC gelöst (siehe 2.10.5), in Medium aufgenommen und auf 125.000 Zellen/ml eingestellt. In jedes Well wurde 1 ml der Zellsuspension gegeben und für 24 h kultiviert (37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit). Am Folgetag musste das Medium abgezogen und der Zellrasen 3 x mit PBS⁺ gewaschen werden. Anschließend konnten die Tumorzellen wie unter 2.17 analog zur Adhäsion an die EZM-Proteine behandelt und aufgetragen werden. Die Inkubationszeit betrug hier 2 h, in denen die Tumorzellen adhärenzieren konnten. Alle weiteren Schritte erfolgten analog zur Adhäsion an die EZM-Proteine (siehe 2.17).

2.19 Analyse der Chemotaxis und Migration der NZK-Zellen

Tumorzellen wurden wie im vorherigen Versuchsansatz vorbehandelt und gefärbt (siehe 2.17). Hier fanden 24-Well Multititerplatten (Multiwell 24-Well Companion Plate) mit eingehängten Einsätzen (*inserts*) (FluoroBlok™) und mit einer Fluoreszenz-blockierenden Membran (8,0 μm Porengröße) Verwendung. Diese bildeten die Grundlage für das Chemotaxis- und Migrationsmodell. Die Einsätze wurden entweder unbeschichtet belassen (Chemotaxis) oder mit einer Kollagenbeschichtung (Migration) verwendet. Die Beschichtung der Einsätze mit 100 μl Kollagen (200 $\mu\text{g/ml}$ in PBS⁻) erfolgte am Vortag mit anschließender Lagerung bei 4 °C über Nacht. Am Folgetag musste die Kollagenlösung verworfen und die Matrix für 1 h mit 100 μl Blockierlösung (5 g/l BSA in PBS⁻) bei RT blockiert werden. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und die Membran 1 x mit PBS⁻ gewaschen. In den unteren Bereich, also in die 24-Well Multititerplatte unterhalb der eingehängten Einsätze, wurden als chemotaktischer Stimulus 800 μl 30 %iges FCS-Vollmedium gegeben. Die

Tumorzellen (60.000 Zellen in 500 µl 10 % FCS-Vollmedium) wurden im oberen Bereich der Membran in die eingehängten Einsätze im Dreifachansatz pipettiert und für 24 h inkubiert (37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit). Tumorzellen, die erfolgreich dem chemotaktischen Reiz folgten, konnten nun unterhalb der Membran detektiert werden. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Membran, das Well und die Multititerplatte mit PBS⁺ (1 ml je Well) gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 1 ml einer 2 %igen Glutaraldehydlösung (40 ml 25 %iges Glutaraldehyd, 460 ml PBS⁻) verteilt auf die Multititerplatte und den eingehängten Einsatz. Nach einer 10-minütigen Inkubation und dem Verwerfen der Fixierlösung erfolgte die Messung der migrierten Zellen unterhalb der Membran mit dem Sapphire Biomolecular Imager (488 nm Laserfarbkanal) und einem Pixelraster von 50 µm zur Fluoreszenzquantifizierung mit der Fokusebene von 2,5 mm. Ein Anteil möglicher Zellen im Medium des unteren Kompartiments wurde, nach Entfernen der Einsätze, mit einer weiteren Messung in der Fokusebene von 1,5 mm überprüft. Zur Messung wurde die Software AzureCapture und zur Auswertung die Software AzureSpot verwendet. Prozentual erfolgte die Normalisierung auf die jeweils unbehandelte Kontrolle = 100 %.

2.20 Migration von NZK-Zellen im Wundheilungstest

Die Migration von Tumorzellen konnte neben dem unter 2.19 beschriebenen Verfahren auch mit dem Wundheilungstest (engl. *Scratch Wound Migration Assay*) detektiert werden. Zur besseren Standardisierung des Versuchs wurden dafür, nach Fenu und Mitarbeitern, Magnete verwendet (202). 200.000 Zellen wurden in 1 ml Vollmedium pro Well in einer 12-Well Multititerplatte ausgesät und über Nacht inkubiert (37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit). Am Folgetag wurde mit Hilfe von Scheibenmagneten eine 1 mm starke „Wunde“ (*Scratch*) horizontal in den Zellrasen der jeweiligen Wells gezogen. Anschließend wurden die Magnete entfernt, das Medium abgezogen, mit PBS⁺ gewaschen und die Zellen mit 1 ml Vollmedium + ART [20, 30, 40, 50 µM] für 24 h behandelt. Eine unbehandelte Kontrolle wurde mitgeführt. Nach der Inkubation wurden insgesamt drei Bilder je Well mit dem inversen Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1 in 50-facher Vergrößerung angefertigt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageJ. Zur Flächenberechnung wurde das Plug-in „*Wound_healing_size_tool*“ (203) verwendet. Dabei wurde ein Schwellenwert von 30 gewählt und die prozentual gesättigten Pixel auf 0,001 gesetzt. Aus insgesamt drei Aufnahmen verschiedener Positionen im Well wurde der Mittelwert gebildet und in das Programm GraphPad übertragen. Pro Bild wurde eine „*Scratch*“-Fläche zum Zeitpunkt null von 2×10^6 Pixel oder 2×1 mm abgebildet, die sich mit dem Migrationsfortschritt verringerte.

2.21 Detektion der Oberflächenexpression von Adhäsionsproteinen (Integrinen)

Entscheidend für die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Bindung sowie zur Signalübermittlung aus der Zelle und in die Zelle sind verschiedene Transmembranproteine. Relevante Adhäsionsrezeptoren sind dabei die Integrine. 24 bekannte Heterodimere aus der Gruppe der Integrine sind beschrieben, die aus 18 alpha- und 8 beta-Untereinheiten aufgebaut sind. Die membranständige Lokalisation der Adhäsionsrezeptoren ermöglicht eine Detektion mittels Durchflusszytometrie.

Für die Versuchsreihen wurden Antikörper verwendet, die das Fluorochrom Phycoerythrin (PE) tragen (siehe 2.8.1, Tabelle 12). Die Zellen wurden aufgrund der vorangegangenen Untersuchungen für drei Tage mit ART [20 µM] oder SHI [1 µM] behandelt. Die Konzentrationen gingen aus den Vorversuchen hervor. Am Versuchstag wurden die Zellen geerntet (2.10.5, 2.10.6). Statt Trypsin wurden hier 3 ml Accutase zum Lösen der Zellen verwendet, um die Oberflächenrezeptoren zu schonen. Nach dem Lösen wurden 7 ml PBS⁻ hinzugegeben, die Zellen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, für 5 min zentrifugiert (500 rcf, 4 °C) und der Überstand verworfen. Im Weiteren wurde auf Eis gearbeitet, um die Zellen im Istzustand zu beobachten. Das Zellpellet wurde in 10 ml FACS-Puffer (5 g/l BSA in PBS⁻) aufgenommen und resuspendiert. Die Zellen wurden erneut bei 4 °C mit 500 rcf für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, entsprechend der Versuchsgröße oder der Anzahl der zu detektierende Antikörper in FACS-Puffer aufgenommen und zu je 1 ml in FACS-Röhrchen aufgeteilt. Die Antikörperfärbung wurde entsprechend der Verdünnungen in Abschnitt 2.8.1 (Tabelle 12) durchgeführt. Zur Identifikation möglicher unspezifischer Bindungen wurde die jeweilige Isotypenkontrolle mitgeführt (siehe 2.8.2, Tabelle 13). Eine ungefärbte Kontrolle wurde zur Bestimmung einer potenziellen Eigenfluoreszenz (= Hintergrund) und zur Kalibrierung des Durchflusszytometers mitgeführt. Die Inkubation erfolgte für 1 h im Dunkeln bei 4 °C. Anschließend wurden zwei Waschschriffe mit FACS-Puffer (1 ml) auf Eis und folgendem Zentrifugieren (500 rcf, 5 min, 4 °C) durchgeführt. Nach dem letzten Schritt wurden die Zellen in 250 – 500 µl (in Abhängigkeit von der Zellmenge) aufgenommen und waren bereit zur Messung im Durchflusszytometer (BD LSRFortessa X-20) mit der Software FACSDiva. Je Probe wurden dazu 10.000 Zellen mit einer Wellenlänge von 561 nm angeregt und mit dem Filter 575/26 detektiert. Zur weiteren Analyse wurde der Mittelwert der Fluoreszenz-Intensität (MFU) gewählt und die entsprechende Isotypenkontrolle subtrahiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FlowJo. Prozentual wurde die Normalisierung auf die jeweils unbehandelte Kontrolle (100 %) durchgeführt.

2.22 Blockade von Integrinsubtypen mit funktionsinhibierenden Antikörpern

Inwiefern ein durch ART oder SHI verändertes Integrin-Expressionsmuster eine funktionelle Relevanz hat, sollte mit funktionsblockierenden Antikörpern analysiert werden. Dazu wurden die Integrine $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\beta 3$ mit entsprechenden Antikörpern funktionell blockiert und die Adhäsion und das Migrationsverhalten der Tumorzellen untersucht.

2.22.1 Adhäsion von NZK-Zellen nach Integrin-Blockade

Die Adhäsion von Tumorzellen an EZM-Proteine und HUVEC wurde wie unter 2.17 und 2.18 durchgeführt. Insgesamt wurden 8×10^6 Tumorzellen für 30 min gefärbt, zentrifugiert (siehe 2.17) und in 16 ml Vollmedium aufgenommen. Je 3 ml Zellsuspension wurden in 5 x 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt und mit 30 μ l des entsprechenden Antikörpers (siehe 2.9.1, Tabelle 14) für 1 h inkubiert (37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit) (Verdünnung 1:100). Eine unbehandelte Kontrolle wurde als Kontrolle mitgeführt. Nach der Inkubation wurden 9 ml Vollmedium hinzugegeben und je 1 ml (125.000 Zellen) im Dreifachansatz in die PBS-Kontrolle, in die mit EZM-Proteinen (Kollagen, Fibronectin) beschichteten und in die mit HUVEC bewachsenen 24-Well Multititerplatten gegeben. Alle weiteren Schritte wurden wie unter 2.17 und 2.18 durchgeführt.

2.22.2 Migration und Chemotaxis von NZK-Zellen nach Integrin-Blockade

Der Versuchsaufbau basierte auf der unter 2.19 aufgeführten Methode. Hier wurden 2×10^6 unbehandelte Tumorzellen für 30 min gefärbt (siehe 2.17), anschließend zentrifugiert und in 10 ml Vollmedium aufgenommen (2×10^5 Zellen pro ml). Zur Antikörper-Inkubation wurden 1.500 μ l (300.000 Zellen) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 15 μ l des jeweiligen Antikörpers (siehe 2.9.1, Tabelle 14) für 1 h inkubiert (37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit) (Verdünnung 1:100). Nach der Inkubation wurden 300 μ l (60.000 Zellen), je zwei technische Replikate für Migration und Chemotaxis, in die Einsätze pipettiert und der Versuch, wie unter 2.19 beschrieben, fortgeführt.

2.23 Datenauswertung und Statistik

Für eine valide Datenauswertung und statistische Analyse wurden alle durchgeführten funktionellen und vertiefenden Versuche mindestens drei- bis fünfmal wiederholt. Die Auswertung und Generierung von Mittelwerten sowie die Normalisierungen in Prozent erfolgten mit Microsoft Excel. Für die grafische Darstellung, Kalkulation von IC/LC-Werten, Berechnung/Verrechnung von Standardgeraden und Kurven, Standardabweichungen und Mittelwerten wurde das Programm GraphPad Prism 7 verwendet. Alle Werte wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung (*SD*) angegeben. Signifikante Unterschiede (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$) wurden über den *p*-Wert definiert mit $p \leq 0,05$ für ein signifikantes *, $p < 0,01$ für ein hochsignifikantes ** und $p < 0,001$ für ein höchstsignifikantes *** Ergebnis. Die Ermittlung von Unterschieden zwischen zwei vorher/nachher Messungen (paarig) oder zwei Gruppen (unabhängig) erfolgte mit dem zweiseitigen *t*-Test, Normalverteilung vorausgesetzt (Apoptose, Western-Blot-Analysen, Adhäsion, Chemotaxis, Migration) oder dem „one-way ANOVA“ (Proliferation, klonogenes Wachstum, Ferroptose-Nachweis, Nekroptose-Nachweis). Zur statistischen Auswertung mehrerer Faktoren diente die zweifache Varianzanalyse „two-way Anova“ (Zellviabilität/Wachstum). Die Korrektur bei multiplen Vergleichen erfolgte nach der konservativen Bonferroni-Methode (204).

3 Ergebnisse

3.1 Resistenznachweis chronisch mit Sunitinib behandelte NZK-Zellen

Dosis-Wirkungskurven (MTT) sollen Aufschluss über den Resistenzstatus chronisch mit Sunitinib behandelte Zellen geben und dienen zur Validierung des gewählten Resistenzmodells. Der IC_{50} -Wert wird hierbei als Indikator genutzt und beschreibt die Konzentration, bei der eine 50 %ige Inhibition des Wachstums der Population innerhalb des gewählten Konzentrationsbereichs vorliegt. Ab einer Verdopplung des IC_{50} im Vergleich zu therapiesensitiven Zellen wird in dieser Studie eine Therapieresistenz definiert. Die Dosis-Wirkungskurven der chronisch mit Sunitinib behandelte Zellen zeigen gegenüber den therapiesensitiven Zellen eine deutliche Verschiebung des Ansprechens (Abbildung 10 a – d). So ist der IC_{50} bei Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen mit $19,13 \mu\text{M}$ ca. 7,5-fach höher als bei parentalen Caki-1 Zellen ($2,58 \mu\text{M}$) (Tabelle 23). Signifikante Unterschiede zwischen parentalen und Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen sind bereits ab einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ Sunitinib zu detektieren (Abbildung 10 a). Die Behandlung der Zelllinie 786-O führt zu einer ca. 2,8-fachen IC_{50} -Verschiebung von $3,97 \mu\text{M}$ in den parentalen Zellen auf $11,16 \mu\text{M}$ in den Sunitinib-resistenten Zellen (Tabelle 23). Die Unterschiede zwischen parentalen und Sunitinib-resistenten 786-O Zellen sind ab einer Konzentration von $2 \mu\text{M}$ Sunitinib signifikant (Abbildung 10 b). In der Zelllinie KTCTL-26 steigt der IC_{50} ca. 2,1-fach von $6,37 \mu\text{M}$ auf $13,31 \mu\text{M}$ (Tabelle 23). In der Zelllinie A-498 steigt der IC_{50} ca. 1,9-fach (Tabelle 23). Zwischen parentalen und Sunitinib-resistenten KTCTL-26 und A-498 Zellen sind ab einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ Sunitinib signifikante Unterschiede detektierbar (Abbildung 10 c + d). Somit erfüllen die Zelllinien Caki-1, 786-O und KTCTL-26 die gesetzten Kriterien. Die A-498 Zellen liegen mit einer IC_{50} -Verschiebung von ca. 1,9 ganz knapp unter der Verdopplung des IC_{50} (Tabelle 23), wurden aber trotzdem weiter mitgeführt. Die Resistenzinduktion ist in den Caki-1 Zellen insgesamt am stärksten ausgeprägt. Deutlich wird, dass die Zellen, die initial sensitiver auf Sunitinib ansprechen, im Verlauf der chronischen Behandlung stärkere Resistenzen ausbilden (Tabelle 23).

Tabelle 23: IC_{50} -Werte der NZK-Zellen nach einer Sunitinib-Behandlung [0,1 – 100 μM] über 72 h

Zelllinie	parental	resistent	Einheit
Caki-1	2,58	19,13	μM
786-O	3,97	11,16	μM
KTCTL-26	6,37	13,31	μM
A-498	10,43	19,3	μM

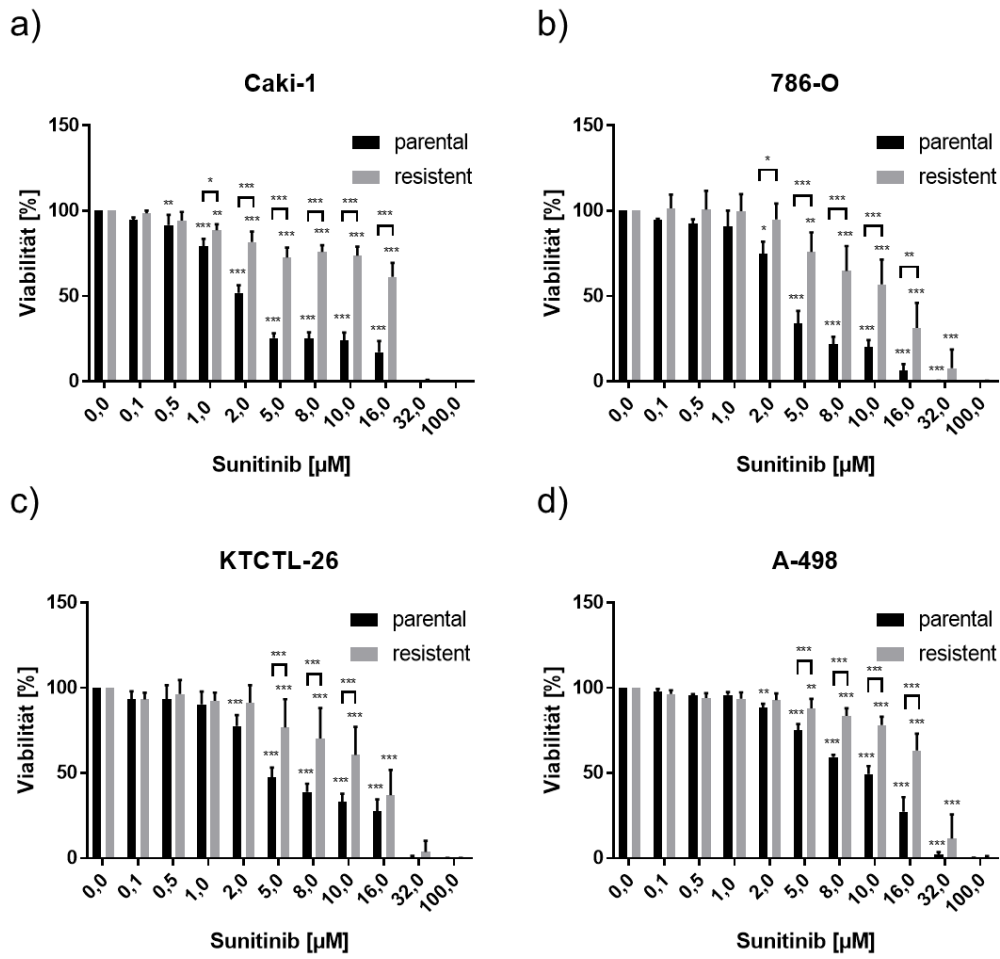


Abbildung 10: Dosis-Wirkungskurven der NZK-Zellen nach Behandlung mit Sunitinib. Das Wachstum (MTT) der Zelllinien Caki-1 (a), 786-O (b), KTCTL-26 (c) und A-498 (d) nach 72 h Inkubation mit Sunitinib [0,1 – 100 µM]. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (= 100 %). Viabilität = Zellwachstum. Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit Ausnahme der Klammern mit Sternchen, die einen signifikanten Unterschied zwischen parentalen und Sunitinib-resistenten Zellen zeigen: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. n = 3.

3.2 Studien zum Wachstumsverhalten der NZK-Zellen nach Behandlung mit ART oder SHI

3.2.1 Bestimmung der Zellviabilität als Indikator für das Zellwachstum

3.2.1.1 Das Tumorzellwachstum nach Behandlung mit ART

ART inhibiert zeit- und dosisabhängig das Wachstum aller parentaler und Sunitinib-resistenter Zelllinien. Jedoch ist das Ansprechen des Zellwachstums auf ART zelltypspezifisch unterschiedlich stark ausgeprägt. Die IC_{50} -Werte der parentalen und Sunitinib-resistenten Zellen einer Zelllinie sind jedoch vergleichbar (Tabelle 24). Ausschließlich in der Zelllinie KTCTL-26 resultiert die Wachstumshemmung in einer Inhibition unter den Ausgangswert (100 %) bei 24 h, d. h. die Zellen werden nicht nur im Zellwachstum gehemmt, sondern ihre Anzahl wird sogar reduziert (Abbildung 11).

Tabelle 24: IC_{50} -Werte der parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen nach ART-Behandlung [1 – 100 μ M]

IC_{50} von ART nach:	48 h	72 h
Caki-1 parental	21,79 μ M	10,41 μ M
Caki-1 resistent	21,95 μ M	11,69 μ M
786-O parental	n. d.	1,62 μ M
786-O resistent	n. d.	1,99 μ M
KTCTL-26 parental	30,04 μ M	17,02 μ M
KTCTL-26 resistent	83,73 μ M	17,79 μ M
A-498 parental	25,47 μ M	12,51 μ M
A-498 resistent	14,32 μ M	12,08 μ M

Unbehandelte parentale Caki-1 Zellen zeigen einen dreifachen Anstieg des Zellwachstums von 100 % nach 24 h auf 183,62 % nach 48 h und auf 281,92 % nach 72 h Inkubation (Abbildung 11 a (parental)). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ist das Wachstum signifikant nach einer Inkubation über 48 h mit 10 μ M ART (132,62 %) und nach 72 h mit 5 μ M ART (218,61 %) inhibiert. In der höchsten Konzentration mit 100 μ M ART ist der Wert nach 48 h auf 91,85 % und auf 83,74 % nach 72 h gegenüber dem Ausgangswert (100 % bei 24 h) reduziert. ART in der höchsten Konzentration resultiert somit in einem Wachstumsstopp. Die zeitabhängige Wachstumsinhibition durch ART wird auch in der Halbierung des IC_{50} deutlich. Der IC_{50} -Wert beträgt nach 48 h 21,79 μ M und nach 72 h 10,41 μ M (Tabelle 24). Unbehandelte Sunitinib-resistente Caki-1 Zellen zeigen ein 2,5-fach gesteigertes Wachstum über 72 h Inkubation. So steigt das Zellwachstum von 100 % auf 154,41 % nach 48 h und auf 245 % nach 72 h Inkubation an (Abbildung 11 a (resistent)). Signifikant reduziert wird dieser Wert durch eine Behandlung mit 25 μ M ART über 48 h

Ergebnisse

(116,11 %) und 5 μM ART über 72 h (195,63 %). 100 μM ART reduzieren nach 48 h das Wachstum auf 101,43 % und nach 72 h Inkubation auf 98,75 %, im Vergleich zur Kontrolle (100 %, 24 h). Das Wachstum der Zellen wird also durch ART in dieser Konzentration vollständig unterbunden. Die IC_{50} -Werte betragen 21,95 μM nach 48 h und 11,69 μM nach einer 72 h Behandlung und liegen damit im Bereich der parentalen Zellen (Tabelle 24). Das Ansprechen der parentalen und Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen auf ART ist somit vergleichbar. Insgesamt sind die parentalen Zellen nach 72 h mit durchschnittlich 281,92 % Wachstum etwas vitaler als die Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen mit 245 %.

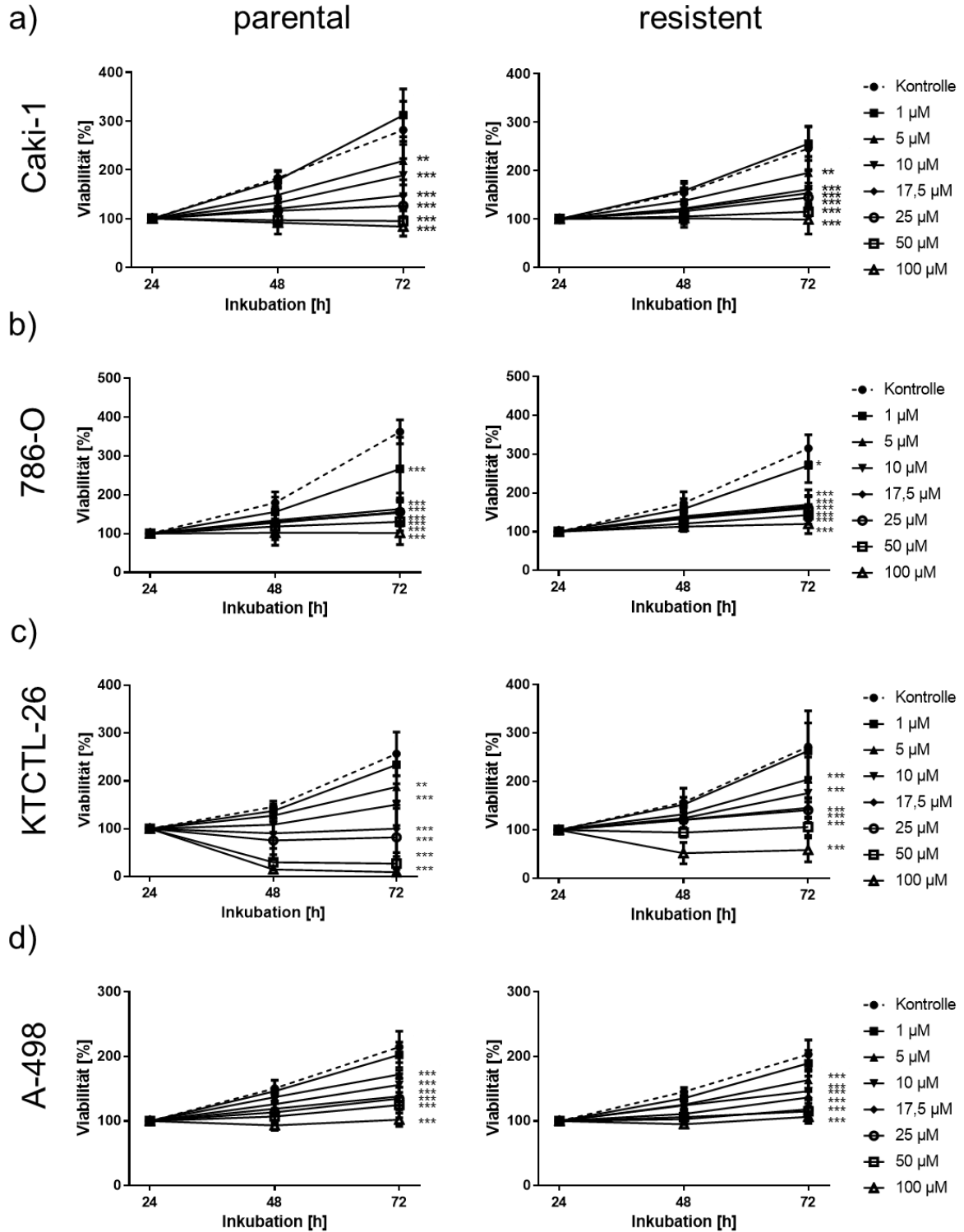


Abbildung 11: Dosis-Wirkungskurven der NZK-Zellen nach Behandlung mit ART [0 – 100 µM]. Wachstumskinetik der Zelllinien Caki-1 (a), 786-O (b), KTCTL-26 (c) und A-498 (d), jeweils parental (linksseitig) und Sunitinib-resistent (rechtsseitig) über drei Zeitpunkte (24, 48, 72 h). Normalisiert auf den 24 h-Wert = 100 %. Viabilität = Zellwachstum. Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (72 h): * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Die ART-Behandlung der parentalen 786-O Zellen resultiert in einer ähnlichen Wachstumsinhibition wie bei den Caki-1 Zellen (Abbildung 11 b (parental)). Die Zellen sprechen jedoch deutlich sensitiver auf ART an. Dies ist besonders nach 72-stündiger Inkubation zu beobachten. Unbehandelte Zellen zeigen eine Verdopplung des Wachstums von 179,64 % (48 h) auf 362,59 % (72 h) und wachsen somit um das 3,6-fache im Inkubationszeitraum an. Signifikant reduziert wird das Wachstum nach 48 h mit 100 μM ART (102,20 %). Nach 72 h Inkubation führt die ART-Gabe bereits mit 1 μM zu einer signifikanten Inhibition des Wachstums (266,77 %) und sinkt bei der maximalen Dosis von 100 μM ART auf 101,76 % ab, das Wachstum wird somit fast vollständig eingestellt. Der IC_{50} -Wert nach 72 h liegt bei 1,62 μM (Tabelle 24). Die unbehandelten Sunitinib-resistenten 786-O Zellen wachsen nach 48 h auf 174,06 % und nach 72 h auf 315,01 % an (Abbildung 11 b (resistent)). Die Behandlung mit ART resultiert ab einer Konzentration von 17,5 μM nach 48 h (134,38 %) und 1 μM nach 72 h (270,98 %) in einer signifikanten Reduktion des Tumorzellwachstums. Vergleichbar zu den parentalen Zellen hemmen 100 μM ART auch in den Sunitinib-resistenten 786-O Zellen das Wachstum nahezu vollständig. So beträgt es nach 48 h lediglich 112,93 % und nach 72 h 120,41 %. Das Ansprechen der Sunitinib-resistenten Zellen auf ART ist dabei vergleichbar mit dem der parentalen 786-O Zellen ($\text{IC}_{50}^{72\text{h}}$: parental = 1,62 μM und Sunitinib-resistent = 1,99 μM) (Tabelle 24). Die parentalen Zellen zeigen auch hier insgesamt ein etwas stärkeres Wachstum (362,59 %) gegenüber den Sunitinib-resistenten 786-O Zellen (315,01 %) (Abbildung 11).

Das Wachstum der parentalen KTCTL-26 Zellen erhöht sich von 100 % nach 24 h auf 145,69 % nach 48 h und auf 256,72 % nach 72 h (Abbildung 11 c (parental)). Signifikant reduziert ist das Wachstum nach 48 h ab einer Konzentration von 17,5 μM ART (90,61 %). Nach 72 h Behandlung kann bereits eine ART-Konzentration von 5 μM eine signifikante Wachstumshemmung induzieren (187,37 %). Nach 48 h mit 100 μM ART wird das Wachstum auf 14,74 % reduziert. Nach 72 h Exposition mit maximaler ART-Konzentration von 100 μM liegt das Wachstum lediglich bei 9,13 %. Somit kann bei den parentalen KTCTL-26 Zellen das Wachstum mit ART auf nahezu 0 reduziert werden. Die zeitabhängige Wirkung von ART wird auch hier in einer Halbierung des IC_{50} -Werts von 30,04 μM (48 h) auf 17,02 μM (72 h) deutlich (Tabelle 24). Unbehandelte Sunitinib-resistente KTCTL-26 Zellen zeigen im Behandlungszeitraum eine Wachstumssteigerung vom Ausgangswert (= 100 %) nach 24 h auf 157,07 % nach 48 h und auf 272,26 % nach 72 h (Abbildung 11 c (resistent)). Signifikant reduziert ist der Wert nach 48 h ab einer Konzentration von 50 μM ART (94,76 %). Nach 72 h wird das Wachstum bereits nach Behandlung mit 5 μM signifikant gehemmt (204,43 %). Die maximale Inhibition mit einer ART-Konzentration von 100 μM liegt bei 52,03 % nach 48 h und bei 58,80 % nach 72 h. Das Wachstum wird somit nicht nur unterbunden, sondern auch reduziert, wenn auch nicht ganz so stark wie in den parentalen

Zellen. Der IC_{50} -Wert liegt nach 48 h bei $83,73 \mu\text{M}$ und nach 72 h Inkubation bei $17,79 \mu\text{M}$ (Tabelle 24). Insgesamt lassen sich die Sunitinib-resistenten Zellen nicht so stark mit ART inhibieren wie die parentalen KTCTL-26 Zellen. Unterschiede im initialen Wachstum zwischen parentalen und Sunitinib-resistenten KTCTL-26 Zellen sind hier hingegen nicht nachweisbar.

Die parentale Zelllinie A-498 zeigt eine Wachstumssteigerung von 100 % nach 24 h auf 150,58 % nach 48 h und auf 214,82 % nach 72 h (Abbildung 11 d (parental)). Signifikant inhibiert werden die Zellen nach 48 h Inkubation ab einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ ART (126,07 %). Nach 72 h reichen hingegen $5 \mu\text{M}$ ART (172,26 %) aus, um das Wachstum signifikant zu inhibieren. Die höchste ART-Konzentration von $100 \mu\text{M}$ resultiert nach 48 h in einer Reduktion des Wachstums auf 93,41 % und nach 72 h Behandlung auf 102,05 %. Das Wachstum wird bei dieser Konzentration somit in Gänze eingestellt. Der IC_{50} -Wert beträgt dabei nach 48 h $24,47 \mu\text{M}$ und nach 72 h Inkubation $12,51 \mu\text{M}$ (Tabelle 24). Die Sunitinib-resistenten A-498 Zellen zeigen ebenfalls eine Verdopplung des Wachstums über die Zeit, von 100 % nach 24 h auf 145,36 % nach 48 h und auf 203,34 % nach 72 h (Abbildung 11 d (resistent)). Sie werden nach 48 h ab einer ART-Konzentration von $10 \mu\text{M}$ signifikant inhibiert (124,42 %). Nach 72 h genügen auch hier $5 \mu\text{M}$ ART, um eine signifikante Inhibition zu induzieren (163,60 %). Die höchste Konzentration von ART [$100 \mu\text{M}$] senkt das Wachstum nach 48 h auf 95,20 % und nach 72 h auf 106,73 % ab. Auch hier wird also das Wachstum vollständig unterbunden. Der IC_{50} -Wert beträgt nach 48 h $14,32 \mu\text{M}$ und nach 72 h $12,08 \mu\text{M}$ (Tabelle 24). Die Sunitinib-resistenten Zellen zeigen dabei ein ähnliches Wachstum und Ansprechen auf ART wie die parentalen A-498 Zellen.

3.2.1.2 Das Tumorzellwachstum nach Behandlung mit SHI

SHI inhibiert zeit- und dosisabhängig das Wachstum aller parentaler und Sunitinib-resistenter Zelllinien (Abbildung 12). Die Zellen sprechen in Bezug auf das Zellwachstum zelltypspezifisch auf SHI an. Die IC_{50} -Werte der parentalen und Sunitinib-resistenten Zellen einer Zelllinie sind dabei vergleichbar (Tabelle 25).

Tabelle 25: IC_{50} -Werte der parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen nach SHI-Behandlung [0,5 – 2,5 μ M]

SHI	IC_{50}	48 h	72 h
	Caki-1 parental	0,48 μ M	0,58 μ M
	Caki-1 resistent	0,95 μ M	0,82 μ M
	786-O parental	1,07 μ M	1,1 μ M
	786-O resistent	1,53 μ M	1,63 μ M
	KTCTL-26 parental	1,18 μ M	1,34 μ M
	KTCTL-26 resistent	1,13 μ M	1,22 μ M
	A-498 parental	1,46 μ M	1,54 μ M
	A-498 resistent	2,26 μ M	1,85 μ M

Das Zellwachstum unbehandelter parentaler Caki-1 Zellen steigt von 100 % nach 24 h auf das 3,5-fache an (48 h: 177,72 %, 72 h: 355,90 %) (Abbildung 12 a (parental)). Die Behandlung mit SHI induziert eine signifikante Reduktion des Wachstums ab einer Konzentration von 0,5 μ M nach 48 h (96,37 %) und nach 72 h (241,64 %). 2,5 μ M SHI reduzieren das Wachstum deutlich nach 48 h (61,2 %) und noch stärker nach 72 h (41,37 %). Der IC_{50} -Wert liegt nach 48 h bei 0,48 μ M und nach 72 h bei 0,58 μ M (Tabelle 25). Das Wachstum unbehandelter Sunitinib-resistenter Caki-1 Zellen verdreifacht sich von 100 % nach 24 h auf 169,22 % nach 48 h und auf 306,29 % nach 72 h (Abbildung 12 a (resistent)). Eine signifikante Wachstumsreduktion liegt ab einer SHI-Konzentration von 1 μ M nach 48 h (78,98 %) und 72 h vor (153,59 %). Die höchste SHI-Gabe [2,5 μ M] reduziert das Zellwachstum noch deutlicher als in den parentalen Zellen (48 h: 21,86 %, 72 h: 10,16%). Auch hier ist der errechnete IC_{50} -Wert im nM-Bereich. Dieser liegt nach 48 h bei 0,95 μ M und nach 72 h bei 0,82 μ M. Parentale Caki-1 Zellen zeigen somit eine etwas stärkere Sensitivität gegenüber SHI ($IC_{50}^{72\text{ h}}$: parental 0,58 μ M gegen resistent 0,82 μ M) (Tabelle 25).

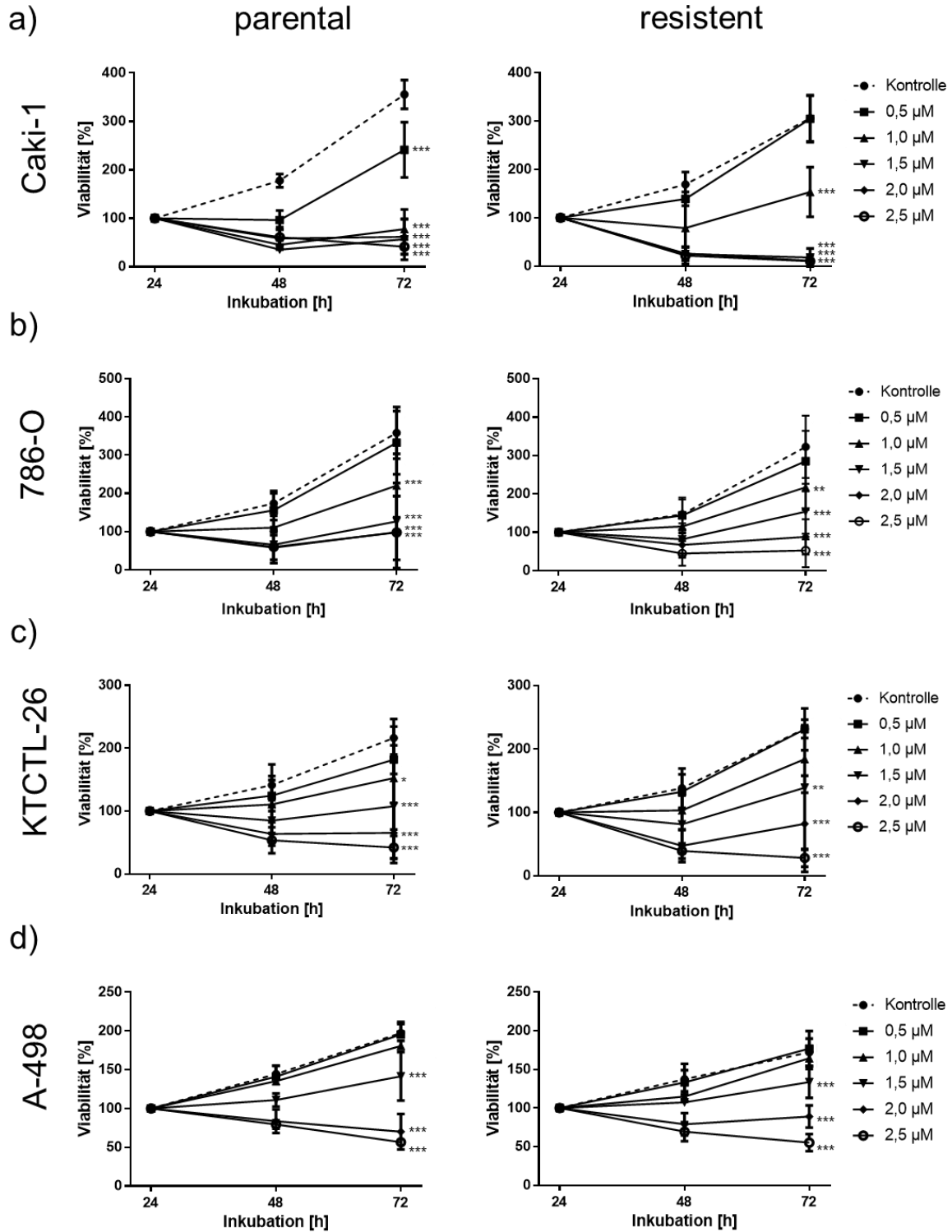


Abbildung 12: Dosis-Wirkungskurven der NZK-Zellen nach Behandlung mit SHI [0,5 – 2,5 µM]. Wachstumskinetik der Zelllinien Caki-1 (a), 786-O (b), KTCTL-26 (c) und A-498 (d), jeweils parental (linksseitig) und Sunitinib-resistent (rechtsseitig) über drei Zeitpunkte (24, 48, 72 h). Normalisiert auf den 24 h-Wert = 100 %. Viabilität = Zellwachstum. Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (72 h): * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Bei der parentalen Zelllinie 786-O ist eine 3,5-fache Wachstumssteigerung über den gesamten Inkubationszeitraum (358,44 %) und eine Verdopplung von 48 h (173,97 %) auf 72 h zu verzeichnen (Abbildung 12 b (parental)). Die Behandlung mit SHI resultiert ab einer Konzentration von 1,5 μM nach 48 h (66,05 %) und von 1 μM nach 72 h (220,49 %) in einer signifikanten Reduktion des Wachstums. Die höhere und maximale Dosis von 2,5 μM SHI hemmt das Wachstum noch stärker, auch über eine Inkubationszeit von 72 h (48 h: 60,02 %, 72 h: 97,97 %). Der IC_{50} liegt nach 48 h bei 1,07 μM und nach 72 h bei 1,1 μM (Tabelle 25). Sunitinib-resistente Zellen zeigen eine Wachstumssteigerung von 100 % nach 24 h auf 146,72 % nach 48 h und auf 322,61 % nach 72 h Inkubation (Abbildung 12 b (resistent)). Signifikant reduziert wird das Wachstum nach 48 h ab einer Behandlung mit 2 μM SHI (67,18 %) und nach 72 h mit 1 μM SHI (217,49 %). Maximal inhibiert ist das Wachstum nach der Behandlung mit SHI [2,5 μM] nach 48 h auf 44,70 % und nach 72 h auf 52,87 %. Der IC_{50} liegt bei 1,53 μM nach 48 h und bei 1,63 μM nach 72 h. Der IC_{50} -Wert der Sunitinib-resistenten Zellen liegt hier somit ebenfalls geringfügig höher als der der parentalen Zellen (Tabelle 25).

Die Kultivierung von parentalen KTCTL-26 Zellen mündet in einer Wachstumszunahme von 100 % nach 24 h auf 141,36 % nach 48 h und auf 216,28 % nach 72 h (Abbildung 12 c (parental)). Eine signifikante Reduktion des Wachstums liegt bei einer Konzentration von 2 μM SHI (63,61 %) nach 48 h und 1 μM SHI (152,51 %) nach 72 h vor. Noch stärker ist der inhibierende Effekt nach Behandlung mit der höchsten SHI-Dosis [2,5 μM] zu detektieren. Hier sinkt das Zellwachstum nach 48 h auf 53,53 % und nach 72 h auf 42,13 %. Der IC_{50} beträgt 1,18 μM nach 48 h und 1,34 μM nach 72 h Inkubationszeit (Tabelle 25). Das Wachstum Sunitinib-resistenter KTCTL-26 Zellen steigt von 100 % nach 24 h auf 138,42 % nach 48 h und auf 231,86 % nach 72 h (Abbildung 12 c (resistent)). Signifikant reduziert ist das Wachstum ab einer SHI-Behandlung mit 2 μM SHI (47,57 %) nach 48 h und 1,5 μM SHI (139,24 %) nach 72 h Inkubation. Die Sunitinib-resistenten Zellen wachsen somit insgesamt etwas schneller als die parentalen KTCTL-26 Zellen, reagieren aber vergleichbar auf SHI ($\text{IC}_{50}^{72\text{h}}$: parental 1,34 μM gegen resistent 1,22 μM) (Tabelle 25).

Das Zellwachstum der parentalen A-498 Zelllinie steigt von 100 % nach 24 h auf 144,47 % nach 48 h und auf 197,38 % nach 72 h (Abbildung 12 d (parental)). Ab einer Dosis von 1,5 μM SHI resultiert die Behandlung in einer signifikanten Inhibition des Wachstums nach 48 h (110,87 %) und 72 h (141,49 %). Die höchste SHI-Konzentration inhibiert das Wachstum sogar unter den Ausgangswert von 100 % (48 h: 79,42 %, 72 h 56,51 %). Der IC_{50} liegt bei 1,13 μM SHI nach 48 h und bei 1,22 μM SHI nach 72 h (Tabelle 25). Sunitinib-resistente A-498 Zellen zeigen ein etwas moderateres Wachstum im Vergleich zur parentalen Kontrolle (Abbildung 12 d (resistent)). Dieses beträgt 137,49 % nach 48 h und

Ergebnisse

steigt auf 172,10 % nach 72 h. Signifikant reduziert wird das Wachstum ab einer Behandlung mit 1 μM SHI über 48 h (114,84 %) und 1,5 μM SHI nach 72 h (133,57 %). Im Vergleich zu den parentalen A-498 Zellen reduzieren auch hier 2,5 μM SHI das Zellwachstum deutlich (48 h: 69,49 %, 72 h 55,40 %). Der IC_{50} liegt bei 2,26 μM nach 48 h und bei 1,85 μM nach 72 h (Tabelle 25). Das Ansprechen der parentalen Zellen gegenüber SHI ist somit etwas sensitiver als das der Sunitinib-resistenten A-498 Zellen, beide liegen aber noch im vergleichbaren Bereich.

3.2.2 Bestimmung der Proliferation

3.2.2.1 Proliferation nach Behandlung mit ART

Die Behandlung mit ART führt in allen getesteten NZK-Zelllinien zu einer zeit- und dosisabhängigen Hemmung der Proliferation (Abbildung 13 – Abbildung 16).

Behandelte Caki-1 Zellen zeigen nach einer Exposition mit ART bereits nach einer 24-stündigen Inkubation ab einer Konzentration von 30 μM (69,59 %) bei parentalen Zellen und 20 μM (76,77 %) bei Sunitinib-resistenten Zellen eine signifikante Reduktion der Proliferation (BrdU-Einbau) (Abbildung 13 a). Nach 48 h ist der Effekt gesteigert und ein signifikantes Ansprechen bereits ab 10 μM sowohl in parentalen (57,62 %) als auch in Sunitinib-resistenten (62,57 %) Zellen zu verzeichnen (Abbildung 13 b). Analog zum Wachstum wird auch hier der stärkste Effekt von ART nach 72 h erzielt. So ist die geringste Proliferation nach 72 h messbar (Abbildung 13 c). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beträgt die Proliferation der parentalen Zellen nach Behandlung mit 50 μM ART nur noch 19,87 % und bei den Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen 31,71 %. Die parentalen Caki-1 Zellen sind somit in Bezug auf die Proliferation ART-sensitiver (Abbildung 13 c).

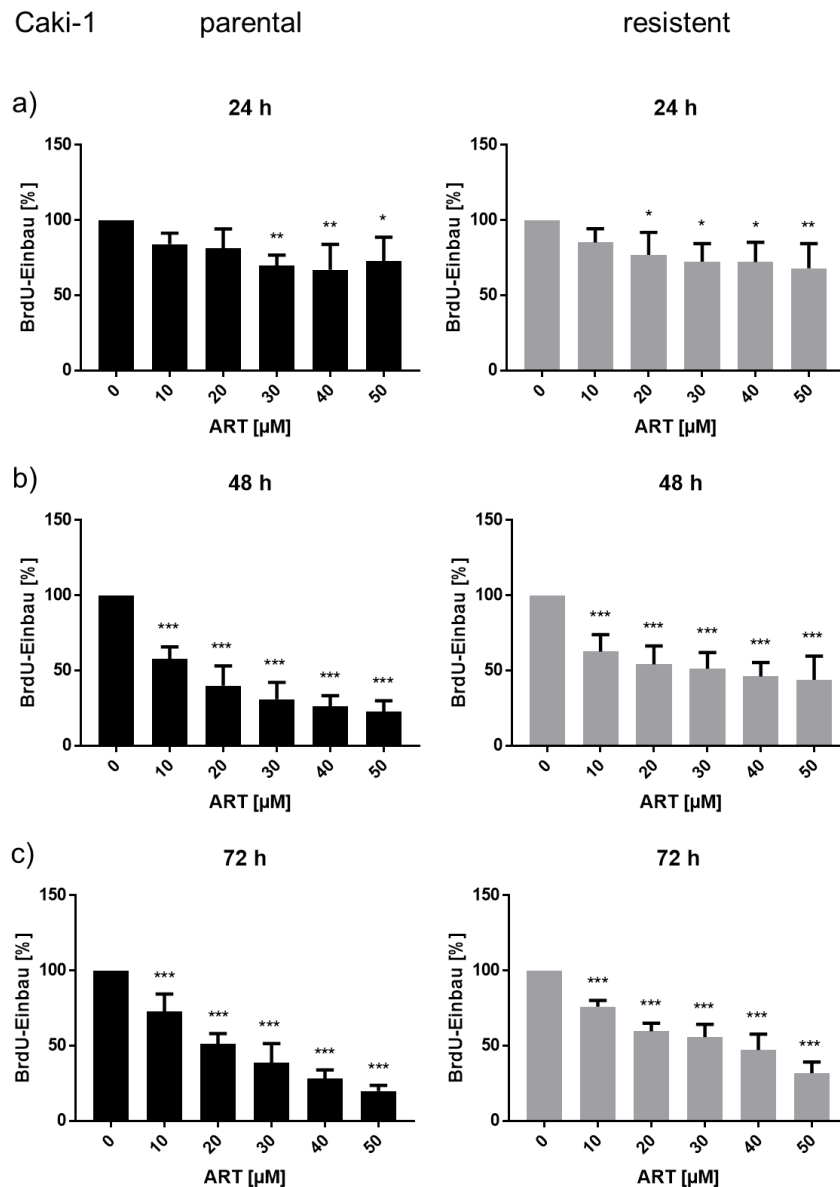


Abbildung 13: Zellproliferation (BrdU) der Caki-1 Zellen nach ART-Behandlung. Parentale (linksseitig) und Sunitinib-resistente (rechtsseitig) Caki-1 Zellen nach 24 h (a), 48 h (b) und 72 h (c) Behandlung mit ART [10 – 50 µM]. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 4.

Auch die Zelllinie 786-O zeigt nach einer 24-stündigen ART-Behandlung bereits eine signifikant verringerte Proliferation (Abbildung 14), die sich im weiteren Inkubationsverlauf fortsetzt oder weiter verstärkt. Nach der 24 h Inkubation ist die Zellteilungsrate bereits ab einer Behandlung mit 20 µM ART (74,90 %) bei parental Zellen und ab 10 µM ART (73,71 %) bei Sunitinib-resistenten 786-O Zellen signifikant reduziert (Abbildung 14 a). Nach 48 h Inkubation ist eine signifikante Reduktion der Proliferation bei 10 µM ART sowohl bei parental Zellen (59,30 %) als auch Sunitinib-resistenten 786-O Zellen (65,58 %) zu verzeichnen (Abbildung 14 b). Die Behandlung mit 50 µM ART führt zu einer maximalen Inhibition der parental Zellen nach 72 h und der Sunitinib-resistenten Zellen nach 48 h

(Abbildung 14 b + c). Insgesamt sprechen die Sunitinib-resistenten 786-O Zellen signifikant früher (24 h) und auf eine geringere Dosierung an (resistent 10 μM gegenüber parental 20 μM), sie sind also sensitiver gegenüber ART.

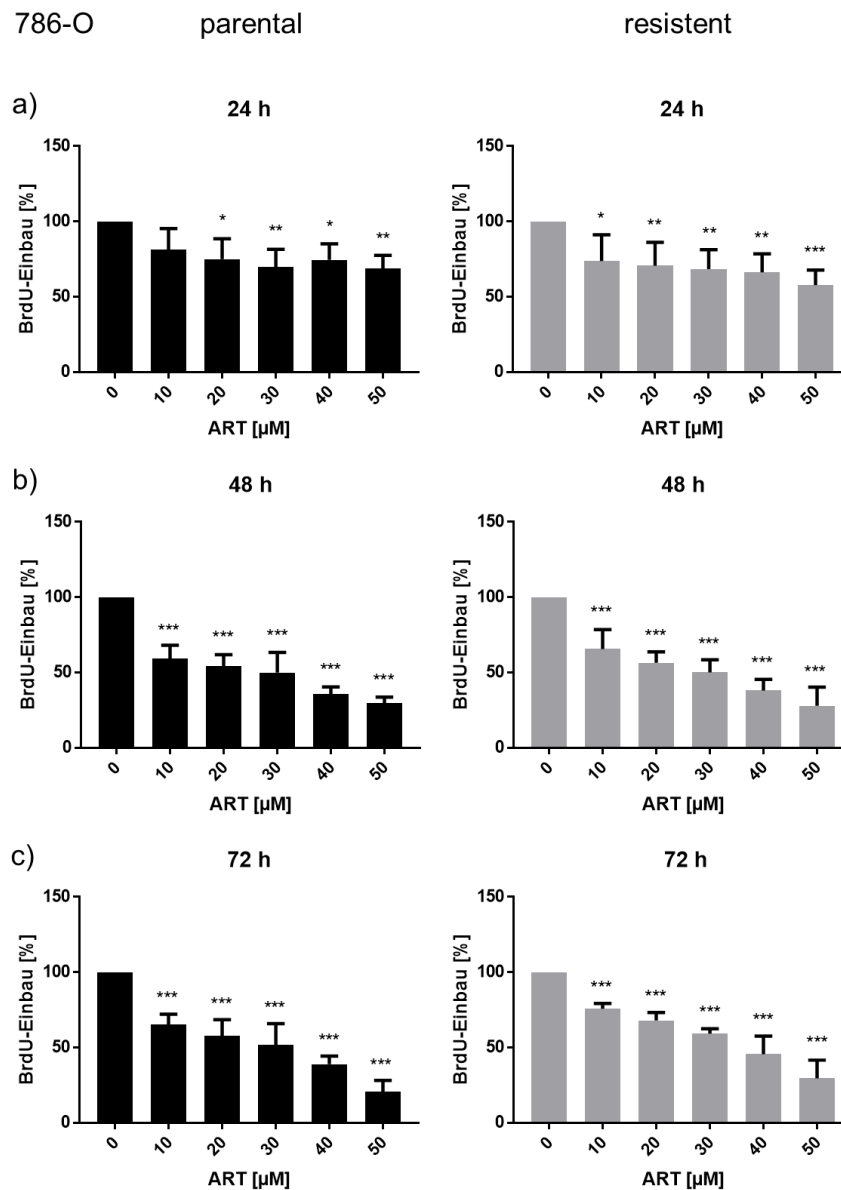


Abbildung 14: Zellproliferation (BrdU) der 786-O Zellen nach ART-Behandlung. Parentale (linksseitig) und Sunitinib-resistente (rechtsseitig) 786-O Zellen nach 24 h (a), 48 h (b) und 72 h (c) Behandlung mit ART [10 – 50 μM]. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 4.

Wie in den vorangegangenen Zelllinien zeigen die KTCTL-26 eine zeit- und dosisabhängige Inhibition der Proliferation nach Behandlung mit ART (Abbildung 15). Nach 24 h tritt der Effekt ab einer Konzentration von 30 μM ART (65,01 %) bei parental Zellen und 50 μM ART (80,14 %) bei Sunitinib-resistenten Zellen auf (Abbildung 15 a). Nach 48 h Inkubation mit ART findet sich die stärkste Wirkung auf die Zellproliferation. Hier zeigen die parental Zellen ab einer Konzentration von 10 μM ART (56,47 %) und die Sunitinib-resistenten Zellen

Ergebnisse

ab einer Konzentration von 20 μM ART (66,34 %) eine signifikante Hemmung der Proliferation (Abbildung 15 b). Nach 72 h ART-Inkubation nimmt die Proliferationshemmung in den parental und Sunitinib-resistenten Zellen hingegen wieder ab. Die parental Zellen sprechen hier ab 20 μM ART und die Sunitinib-resistenten KTCTL-26 Zellen ab 30 μM ART signifikant an. Die Zellteilungsrate ist maximal reduziert nach 72 h mit 50 μM ART. Parentale Zellen zeigen nach diesem Zeitraum nur noch 3,71 % und Sunitinib-resistente KTCTL-26 Zellen 34 % Proliferation gegenüber der jeweiligen unbehandelten Kontrolle (100 %) (Abbildung 15 c). Insgesamt sprechen die parental KTCTL-26 Zellen sensibler auf ART an.

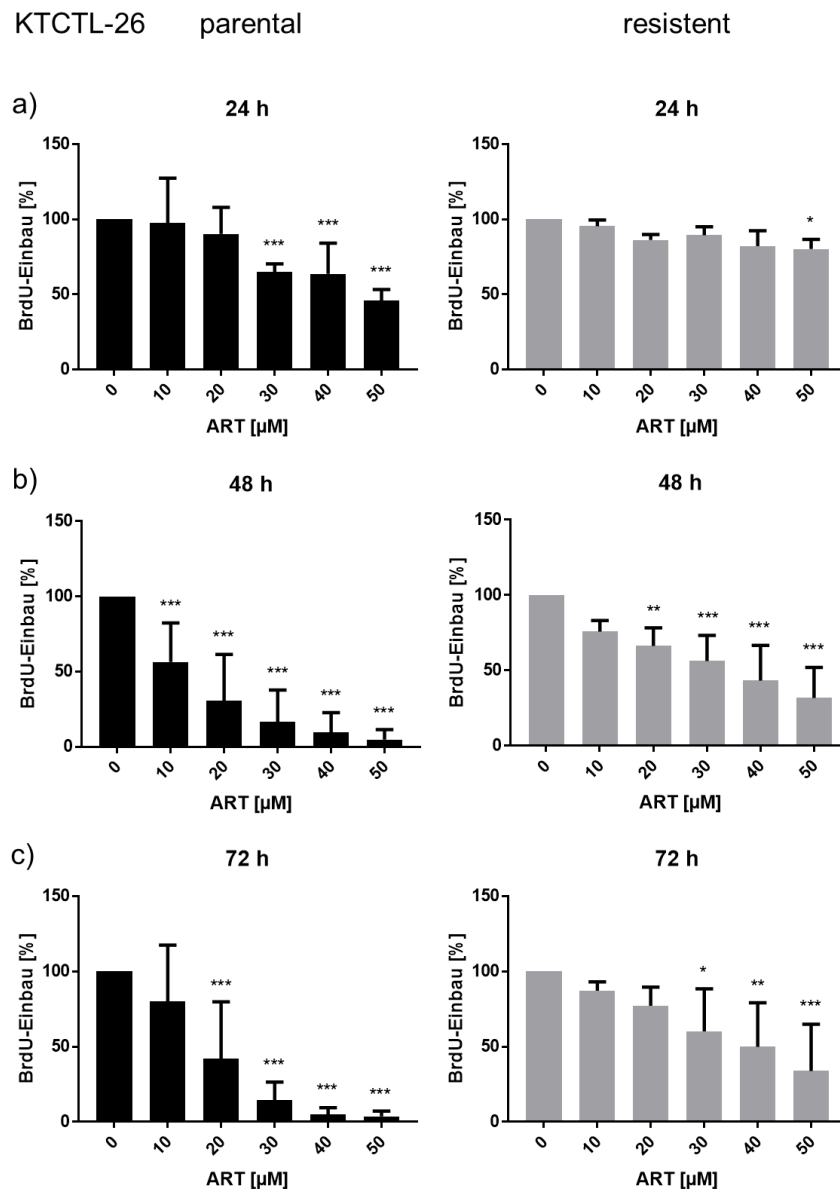


Abbildung 15: Zellproliferation (BrdU) der KTCTL-26 Zellen nach ART-Behandlung. Parentale (linksseitig) und Sunitinib-resistente (rechtsseitig) KTCTL-26 Zellen nach 24 h (a), 48 h (b) und 72 h (c) Behandlung mit ART [10 – 50 μM]. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 4.

Parentale A-498 Zellen zeigen unter Applikation von 30 μM ART erst nach 72 h Inkubation eine signifikante Reduktion der Zellteilung (Abbildung 16 c (parental)). Die Inkubation mit ART über 24 und 48 h kann hier keine signifikanten Effekte erzielen (Abbildung 16 a + b (parental)). Die Sunitinib-resistenten A-498 Zellen sprechen hingegen nach 48 h (73,94 %) und 72 h (67,74 %) ab einer Konzentration von 20 μM ART mit einer signifikanten Inhibition an (Abbildung 16 b + c (resistent)). Maximal gehemmt wird die Zellteilung nach 72 h ART-Behandlung mit 50 μM (parental: 29,96 % / resistent: 44,93 %) (Abbildung 16 c).

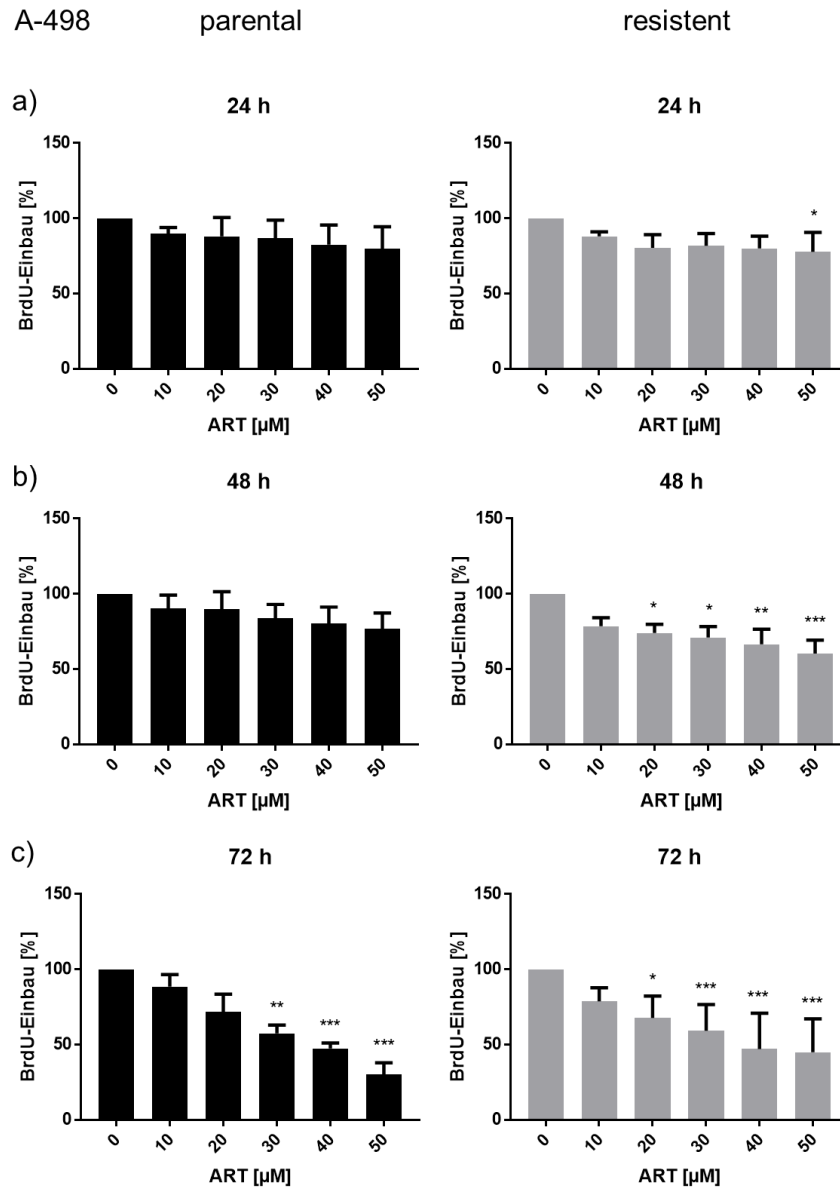


Abbildung 16: Zellproliferation (BrdU) der A-498 Zellen nach ART-Behandlung. Parentale (linksseitig) und Sunitinib-resistente (rechtsseitig) A-498 Zellen nach 24 h (a), 48 h (b) und 72 h (c) Behandlung mit ART [10 – 50 μM]. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 4.

3.2.2.2 Proliferation nach Behandlung mit SHI

Die Behandlung mit SHI führt in allen getesteten NZK-Zelllinien zu einer dosisabhängigen Hemmung der Proliferation. Dabei ist hier generell ein starker antiproliferativer Effekt bereits nach kurzzeitiger SHI-Behandlung zu beobachten, der mit der Zeit abschwächt (Abbildung 17 – Abbildung 19). Die Zelllinie A-498 zeigt hier die geringste Sensitivität für SHI (Abbildung 20).

Die Behandlung mit SHI resultiert ebenfalls in einer signifikanten Reduktion der Proliferation von Caki-1 Zellen (Abbildung 17). Nach 24 h ist die Proliferation ab einer Konzentration von 1,5 μM SHI bei den parentalen Zellen (68,61 %) und ab 2 μM SHI (64,68 %) bei den Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen signifikant inhibiert (Abbildung 17 a). Auch nach längerer Inkubation von 48 h mit 1,5 μM SHI (69,64 %) und 72 h mit 2 μM SHI (65,79 %) bei parentalen Caki-1 Zellen ist ein solcher Effekt detektierbar (Abbildung 17 a (parental)). Sunitinib-resistente Caki-1 Zellen zeigen nach 48 h mit 2,5 μM SHI (62,43 %) (Abbildung 17 b (resistent)) ebenfalls eine signifikante und nach 72 h eine Tendenz zur Inhibition der Proliferation (Abbildung 17 c (resistent)).

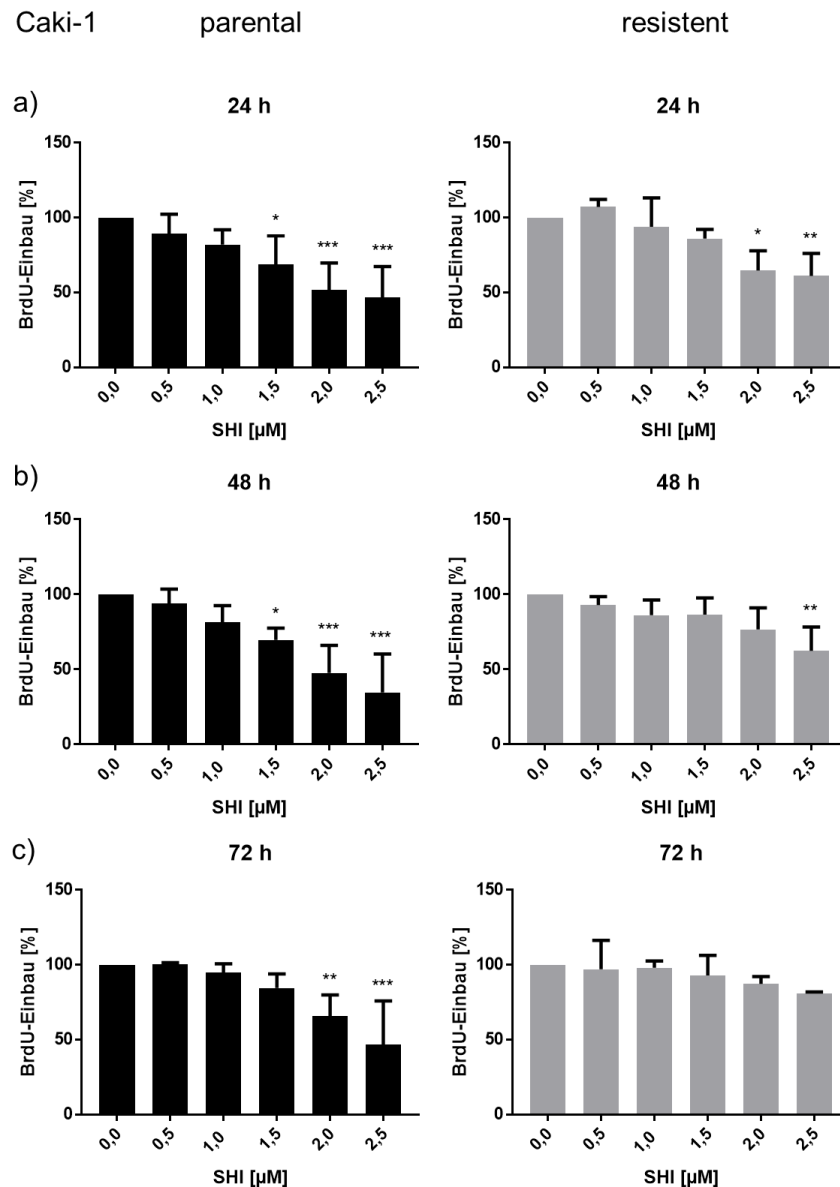


Abbildung 17: Zellproliferation (BrdU) der Caki-1 Zellen nach SHI-Behandlung. Parentale (linksseitig) und Sunitinib-resistente (rechtsseitig) Caki-1 Zellen nach 24 h (a), 48 h (b) und 72 h (c) Behandlung mit SHI [0,5 – 2,5 µM]. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 4.

Die Behandlung mit SHI induziert weiterhin eine Inhibition der Proliferation der 786-O Zellen über den gesamten Behandlungszeitraum von 24, 48 und 72 h (Abbildung 18 a – c). Die Inkubation über 24 h zeigt hier die stärksten Effekte. So ist die Proliferation parentaler 786-O Zellen nach einer SHI-Gabe von 1 µM auf 74,34 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100 %) signifikant reduziert (Abbildung 18 a (parental)). Die Sunitinib-resistenten 786-O Zellen zeigen hingegen ein signifikantes Ansprechen ab einer SHI-Behandlung mit 1,5 µM (52,91 %) (Abbildung 18 a (resistent)). Nach 48 h ist bei beiden Zelllinien, parental (56,97 %) und Sunitinib-resistent (67,42 %), nach einer SHI-Behandlung mit 1,5 µM eine signifikante Proliferationshemmung zu erkennen (Abbildung 18 b). Nach 72 h nimmt der Effekt weiter ab.

So ist die Proliferation hier bei den parentalen Zellen erst ab einer SHI-Konzentration von 2 μM (40,51 %) signifikant gehemmt und bei den Sunitinib-resistenten 786-O Zellen sogar erst ab 2,5 μM SHI (53,16 %) (Abbildung 18 c).

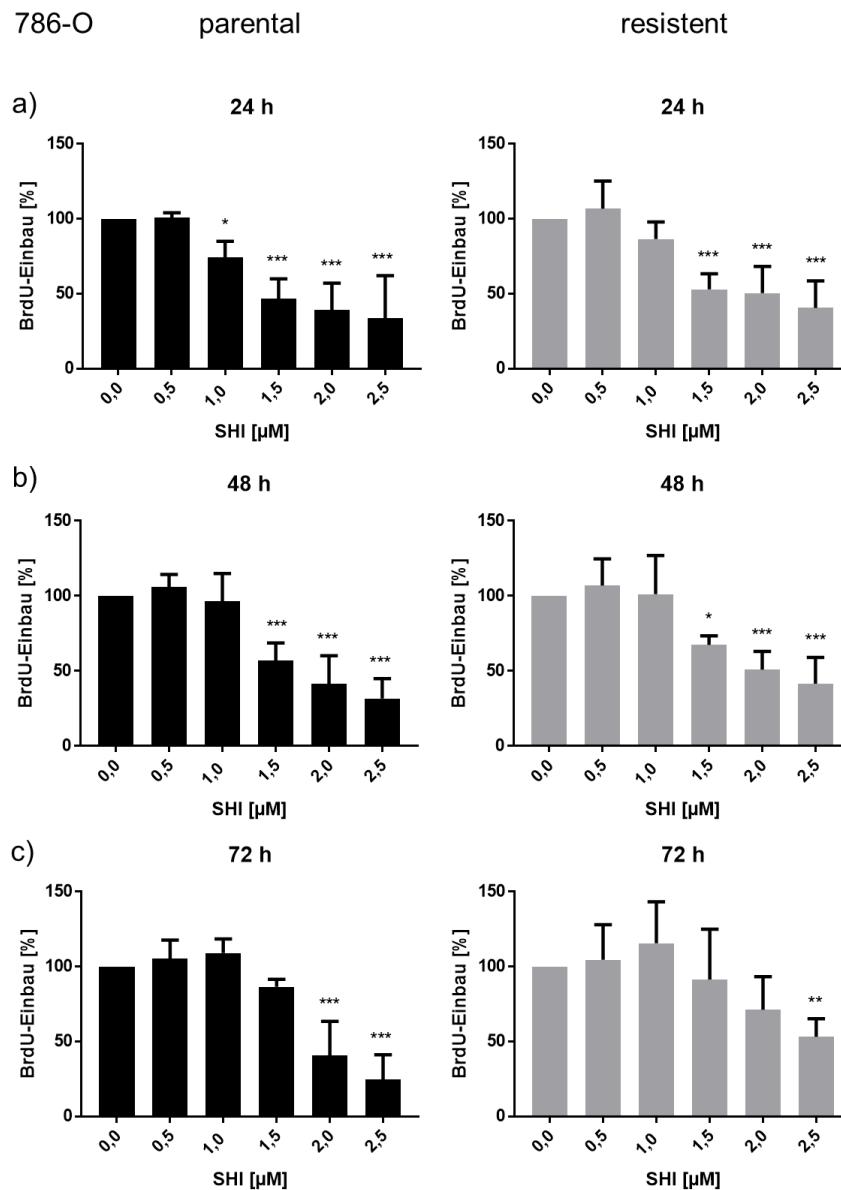


Abbildung 18: Zellproliferation (BrdU) der 786-O Zellen nach SHI-Behandlung. Parentale (linksseitig) und Sunitinib-resistente (rechtsseitig) 786-O Zellen nach 24 h (a), 48 h (b) und 72 h (c) Behandlung mit SHI [0,5 – 2,5 μM]. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 4.

KTCTL-26 Zellen zeigen nach 24-stündiger Behandlung mit 1 μM SHI eine signifikante Inhibition der Proliferation parentaler (58,26 %) und Sunitinib-resistenter (63,55 %) Zellen (Abbildung 19 a). Parentale und Sunitinib-resistente KTCTL-26 Zellen weisen nach 48 h vergleichbare Effekte auf, jedoch mit einer verringerten Gesamteinhibition und einer Verschiebung des signifikanten Ansprechens auf 1,5 μM SHI. Die Proliferation parentaler Zellen ist bei dieser Konzentration auf 40,14 % und Sunitinib-resistenter Zellen auf 29,55 %

reduziert (Abbildung 19 b). Die Gabe von 0,5 μM SHI nach 24 h und 0,5 – 1 μM SHI nach 48 h zeigt keine Effekte auf die Proliferation. Nach 72 h nimmt auch hier die Wirkung von SHI wieder ab. Ein signifikantes Ansprechen ist hier sowohl in parentalen Zellen (41,77 %) als auch in Sunitinib-resistenten Zellen (12,21 %) erst ab einer Konzentration von 2 μM SHI zu erkennen (Abbildung 19 c). Die Sunitinib-resistenten Zellen reagieren dabei etwas stärker.

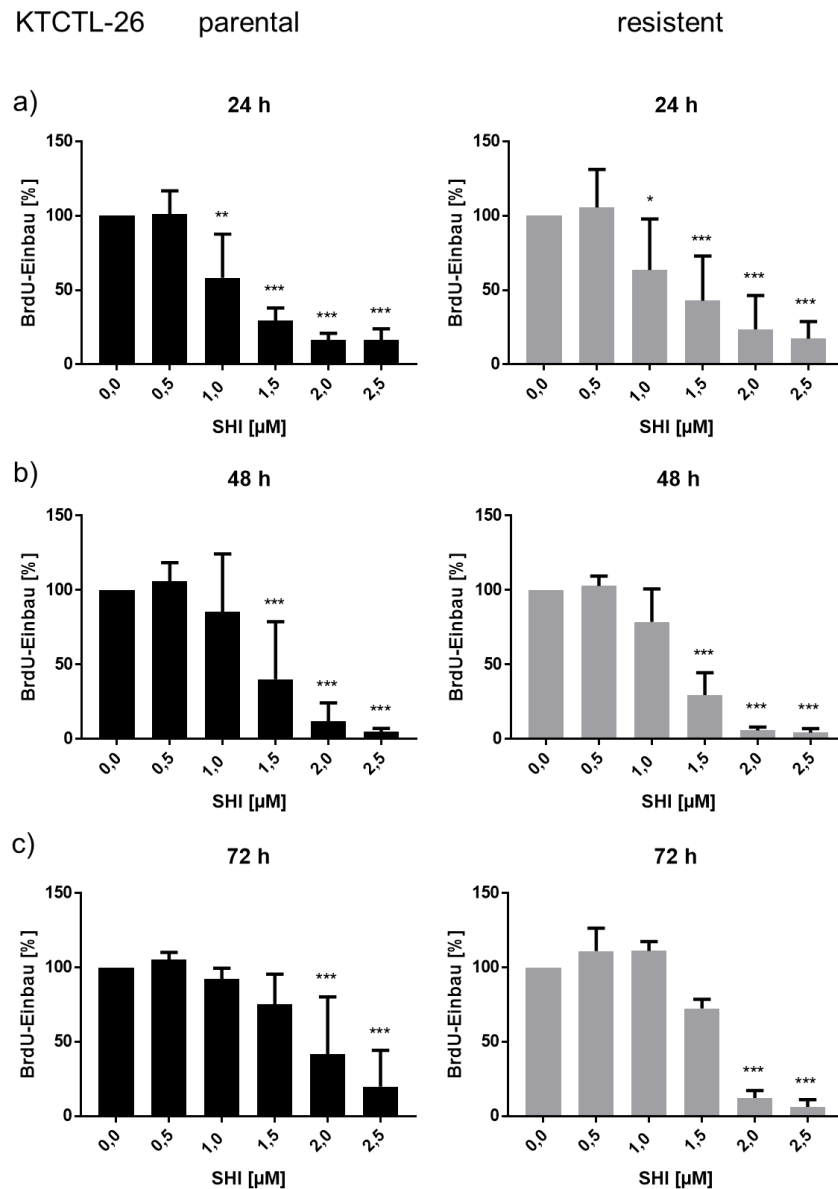


Abbildung 19: Zellproliferation (BrdU) der KTCTL-26 Zellen nach SHI-Behandlung. Parentale (linksseitig) und Sunitinib-resistente (rechtsseitig) KTCTL-26 Zellen nach 24 h (a), 48 h (b) und 72 h (c) Behandlung mit SHI [0,5 – 2,5 μM]. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 4.

Weiterhin führt die Behandlung mit SHI in den parental und Sunitinib-resistenten A-498 Zellen nach 24 h bei einer Konzentration von 2,5 μM (parental: 32,97 % / resistant: 49,21 %) zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (100 %) (Abbildung 20 a). Eine längere Behandlung über 48 und 72 h kann hingegen keine signifikante Proliferationshemmung induzieren (Abbildung 20 b + c).

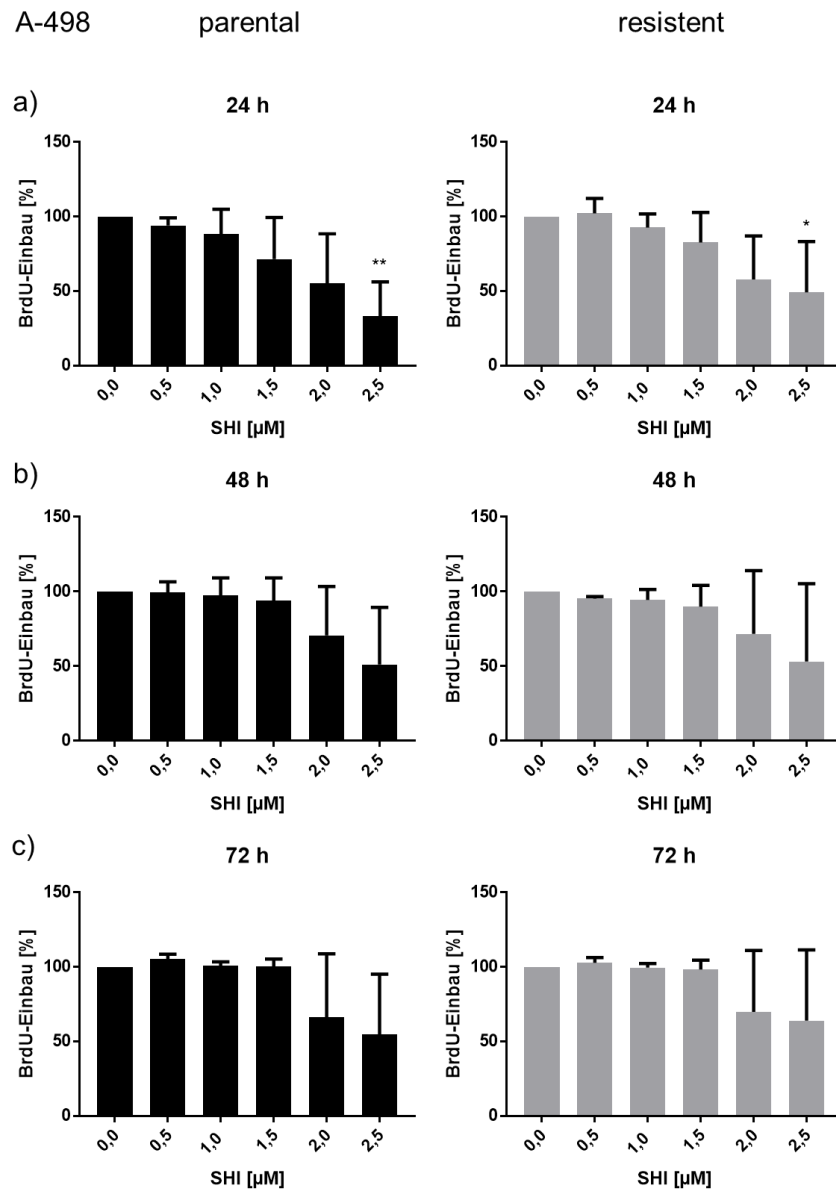


Abbildung 20: Zellproliferation (BrdU) der A-498 Zellen nach SHI-Behandlung. Parentale (linksseitig) und Sunitinib-resistente (rechtsseitig) A-498 Zellen nach 24 h (a), 48 h (b) und 72 h (c) Behandlung mit SHI [0,5 – 2,5 μM]. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 4.

3.2.3 Bestimmung des klonogenen Wachstums

Die getesteten Zelllinien (Caki-1, 786-O, KTCTL-26 und A-498) sprechen mit einer signifikanten Reduktion der Zellkolonien auf eine ART- [10 – 50 μM] und SHI-Behandlung [0,1 – 0,5 μM] an (Abbildung 21 – Abbildung 28). Die basale Fähigkeit, Kolonien aus Einzelzellen auszubilden, ist bei unbehandelten parentalen und Sunitinib-resistenten Zelllinien vergleichbar. Lediglich die Zelllinie KTCTL-26 zeigt eine Abweichung zwischen parentalen und Sunitinib-resistenten Zellen (Abbildung 23, Abbildung 27). Insgesamt haben Sunitinib-resistente Zellen ein geringeres Potenzial, Kolonien auszubilden, welche zudem eine verringerte Größe aufzeigen. Am stärksten ausgeprägt kann das klonogene Wachstum bei der Zelllinie 786-O beobachtet werden. Im Versuchsaufbau zeigen diese ohne Behandlung nach 10 Tagen eine fast vollständige Konfluenz.

3.2.3.1 Klonogenes Wachstum nach Behandlung mit ART

Die Behandlung der Zelllinie Caki-1 mit ART resultiert nach 10 Tagen Inkubation dosisabhängig in einer signifikanten Reduktion der Kolonienanzahl (Abbildung 21). Bei einer Konzentration von 10 μM wird das klonogene Wachstum der parentalen Zellen auf 71,23 % und der Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen auf 64,63 % vermindert. Die Gabe von 50 μM ART induziert in den parentalen und Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen eine Reduktion des klonogenen Wachstums von über 90 %. So sinkt die Kolonienzahl bei den parentalen Zellen auf 1,11 % und bei den Sunitinib-resistenten Zellen auf 9,73 %. Parentale Caki-1 Zellen reagieren somit in Bezug auf das klonogene Wachstum sensibler auf ART als die Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen (Abbildung 21 a). Makroskopisch ist dabei erkennbar, dass die einzelnen Kolonien der parentalen Zellen insgesamt größer sind (Abbildung 21 b).

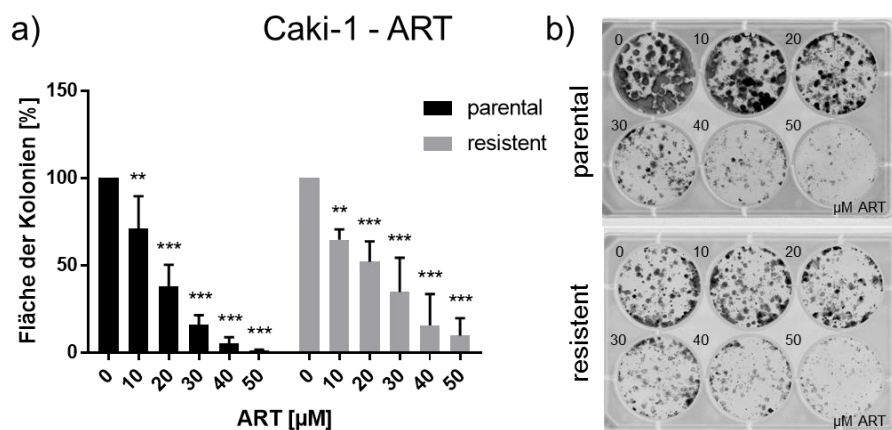


Abbildung 21: Klonogenes Wachstum der Caki-1 Zellen nach ART-Behandlung. Parentale und Sunitinib-resistente Caki-1 Zellen über 10 Tage mit ART [10 – 50 μM] inkubiert. Eine Kolonie entspricht > 50 Zellen. Klonogenes Wachstum in Prozent (a). Abbildung eines repräsentativen Versuchs (b). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Die Behandlung der Zelllinie 786-O induziert eine signifikante Reduktion der parentalen und Sunitinib-resistenten 786-O Zellen ab 10 μM ART (parental: 54,78 % / resistent: 46,86 %) (Abbildung 22 a). Nach Behandlung mit 50 μM ART sind bei den parentalen Zellen keine und Sunitinib-resistenten 786-O Zellen nur noch vereinzelte Kolonien detektierbar. Insgesamt weisen die 786-O Zellen ein hohes Potenzial auf, Kolonien auszubilden (Abbildung 22 b). So zeigen unbehandelte parentale und Sunitinib-resistente 786-O Zellen nach 10 Tagen Inkubation eine hohe Konfluenz von 80 – 100 % (Abbildung 22 b).

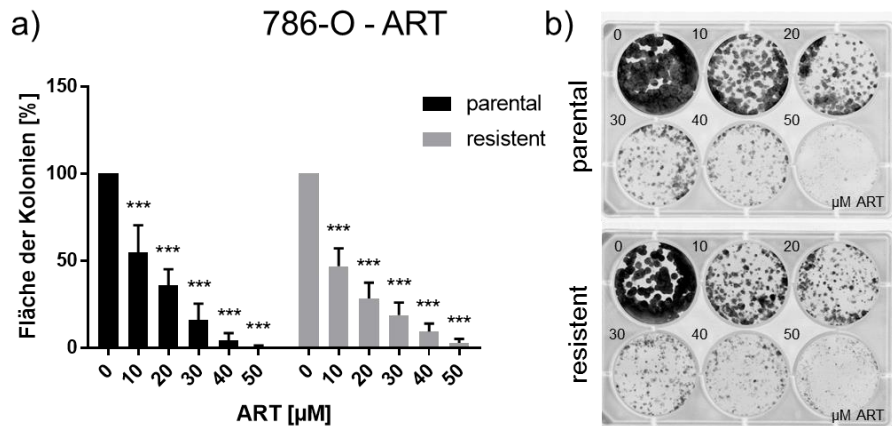


Abbildung 22: Klonogenes Wachstum der 786-O Zellen nach ART-Behandlung. Parentale und Sunitinib-resistente 786-O Zellen über 10 Tage mit ART [10 – 50 μM] inkubiert. Eine Kolonie entspricht > 50 Zellen. Klonogenes Wachstum in Prozent (a). Abbildung eines repräsentativen Versuchs (b). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Die Zelllinie KTCTL-26 reagiert äußerst sensitiv auf eine ART-Behandlung (Abbildung 23). Die Inkubation mit 10 μM ART resultiert in einer signifikanten Inhibition des klonogenen Wachstums auf 28,73 % in den parentalen Zellen und auf 49,38 % in den Sunitinib-resistenten KTCTL-26 Zellen im Vergleich zu den jeweils unbehandelten Kontrollen. Ab einer Gabe von 30 μM ART bei parentalen Zellen und 50 μM ART bei Sunitinib-resistenten Zellen werden keine Kolonien mehr ausgebildet (Abbildung 23 a + b). Makroskopisch ist erkennbar, dass auch hier unbehandelte parentale Zellen deutlich mehr und größere Kolonien im Vergleich zu Sunitinib-resistenten Zellen ausbilden (Abbildung 23 b).

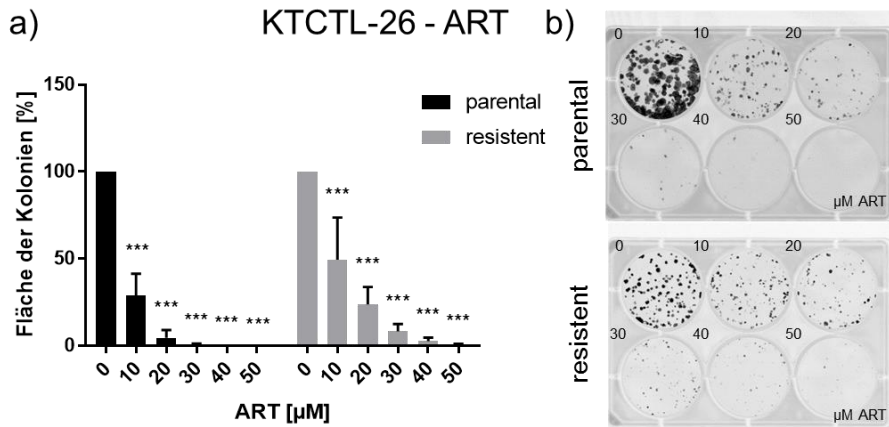


Abbildung 23: Klonogenes Wachstum der KTCTL-26 Zellen nach ART-Behandlung. Parentale und Sunitinib-resistente KTCTL-26 Zellen über 10 Tage mit ART [10 – 50 µM] inkubiert. Eine Kolonie entspricht > 50 Zellen. Klonogenes Wachstum in Prozent (a). Abbildung eines repräsentativen Versuchs (b). Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Die Behandlung der Zelllinie A-498 mit 10 µM ART mündet in einer signifikanten Reduktion der Kolonien (parental: 35,22 % / resistant: 31,48 %) (Abbildung 24). Ab einer Konzentration von 40 µM sind weder bei parentalen noch bei Sunitinib-resistenten Zellen Kolonien zu detektieren (Abbildung 24 a). Wie makroskopisch sichtbar, haben parentale und Sunitinib-resistente A-498 Zellen im Vergleich zu den anderen Zelllinien bereits unbehandelt nur ein geringes Potenzial Kolonien auszubilden (Abbildung 24 b).

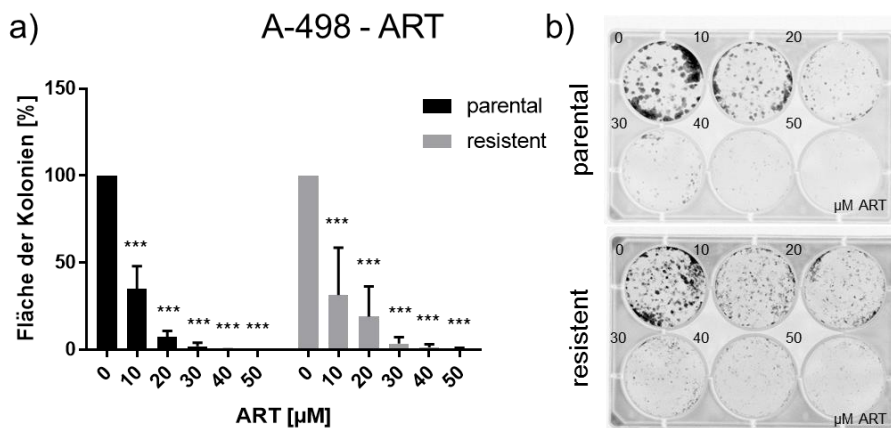


Abbildung 24: Klonogenes Wachstum der A-498 Zellen nach ART-Behandlung. Parentale und Sunitinib-resistente A-498 Zellen über 10 Tage mit ART [10 – 50 µM] inkubiert. Eine Kolonie entspricht > 50 Zellen. Klonogenes Wachstum in Prozent (a). Abbildung eines repräsentativen Versuchs (b). Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

3.2.3.2 Klonogenes Wachstum nach Behandlung mit SHI

Die Behandlung mit SHI führt ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Kolonien bei parentalen (47,68 %) und Sunitinib-resistenten (20,57 %) Caki-1 Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100 %) ab einer Konzentration von 0,2 μM (Abbildung 25). Ab einer Konzentration von 0,4 μM SHI können keine Kolonien mehr detektiert werden. Im Gegensatz zur ART-Behandlung zeigen die Sunitinib-resistenten Zellen ein sensitiveres Ansprechen nach SHI-Gabe als die parentalen Caki-1 Zellen (Abbildung 25 a + b). Hier findet sich ein deutlich geringerer Bewuchs der Wachstumsfläche nach SHI-Behandlung (Abbildung 25 b).

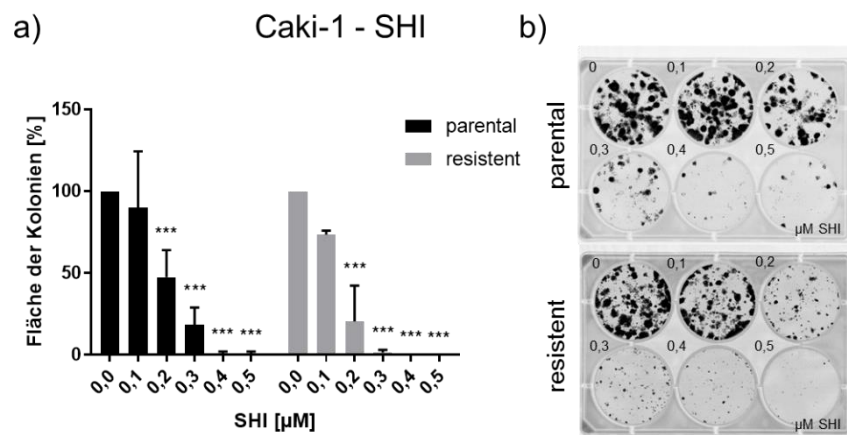


Abbildung 25: Klonogenes Wachstum der Caki-1 Zellen nach SHI-Behandlung. Parentale und Sunitinib-resistente Caki-1 Zellen über 10 Tage mit SHI [0,1 – 0,5 μM] inkubiert. Eine Kolonie entspricht > 50 Zellen. Klonogenes Wachstum in Prozent (a). Abbildung eines repräsentativen Versuchs (b). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

In den 786-O Zellen induziert die Inkubation mit SHI eine signifikante Inhibition des klonogenen Wachstums bereits ab 0,2 μM auf 35,58 % in den parentalen Zellen und auf 31,05 % in den Sunitinib-resistenten 786-O Zellen (Abbildung 26 a). Ab 0,3 μM SHI sind bei den parentalen und Sunitinib-resistenten 786-O Zellen keine oder nur noch vereinzelte Kolonien zu detektieren (Abbildung 26 a + b).

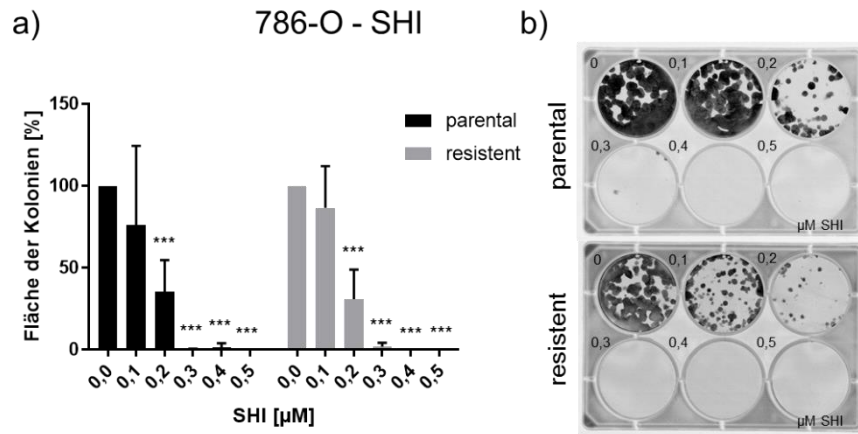


Abbildung 26: Klonogenes Wachstum der 786-O Zellen nach SHI-Behandlung. Parentale und Sunitinib-resistente 786-O Zellen über 10 Tage mit SHI [0,1 – 0,5 μM] inkubiert. Eine Kolonie entspricht > 50 Zellen. Klonogenes Wachstum in Prozent (a). Abbildung eines repräsentativen Versuchs (b). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Auch die KTCTL-26 Zellen werden nach Behandlung mit 0,2 μM SHI signifikant in der Ausbildung von Kolonien gehemmt (Abbildung 27 a + b). Das klonogene Wachstum der parentalen Zellen wird dabei auf 43,97 % und der Sunitinib-resistenten KTCTL-26 Zellen auf 37,51 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100 %) reduziert. Der inhibitorische Effekt nimmt mit aufsteigender Konzentration zu. So fällt der prozentuale Anteil an Kolonien nach einer 0,5 μM SHI-Gabe für parentale Zellen auf 3,01 % und für Sunitinib-resistente KTCTL-26 Zellen auf 1,23 % ab.

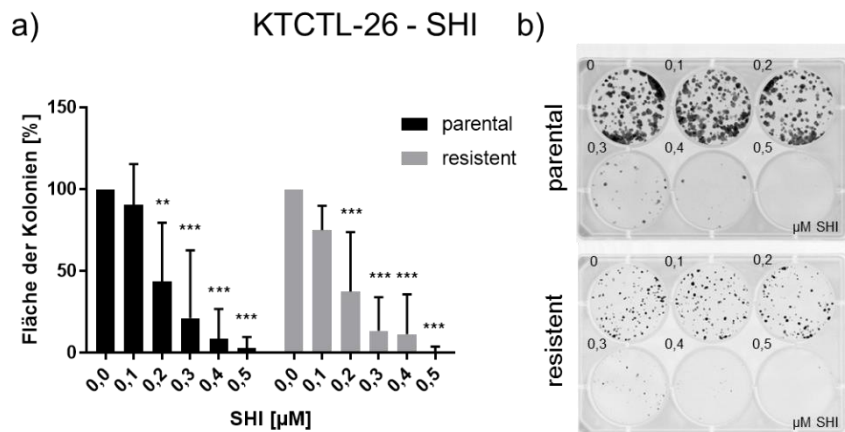


Abbildung 27: Klonogenes Wachstum der KTCTL-26 Zellen nach SHI-Behandlung. Parentale und Sunitinib-resistente KTCTL-26 Zellen über 10 Tage mit SHI [0,1 – 0,5 μM] inkubiert. Eine Kolonie entspricht > 50 Zellen. Klonogenes Wachstum in Prozent (a). Abbildung eines repräsentativen Versuchs (b). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Die Inkubation mit SHI führt bei A-498 Zellen zu einem signifikanten hemmenden Effekt auf die Ausbildung von Kolonien ab 0,3 μM (parental: 33,66 % / resistant: 57,93 %) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100 %) (Abbildung 28 a). Die Behandlung mit 0,5 μM SHI resultiert in einer Reduktion der Kolonieausbildung im einstelligen prozentualen Bereich (parental: 6,07 % / resistant: 7,76 %). Makroskopisch ist eine konzentrationsabhängige, nahezu lineare Inhibition zu erkennen (Abbildung 28 b).

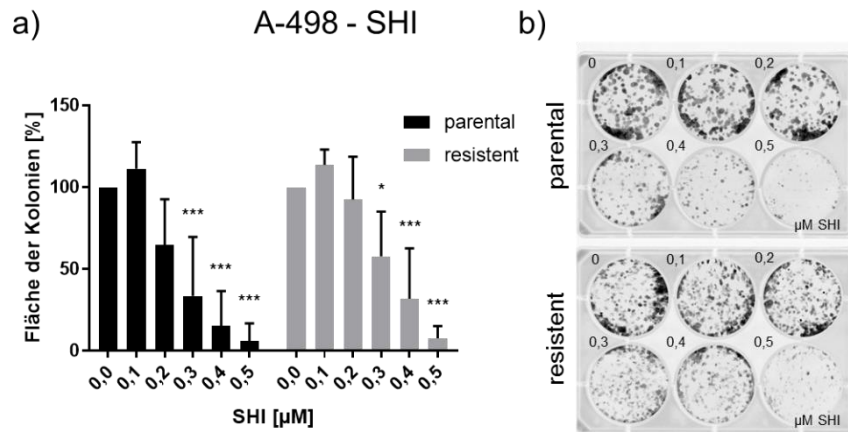


Abbildung 28: Klonogenes Wachstum der A-498 Zellen nach SHI-Behandlung. Parentale und Sunitinib-resistente A-498 Zellen über 10 Tage mit SHI [0,1 – 0,5 μM] inkubiert. Eine Kolonie entspricht > 50 Zellen. Klonogenes Wachstum in Prozent (a). Abbildung eines repräsentativen Versuchs (b). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

3.3 Zellzyklusanalysen

3.3.1 Der Einfluss von ART und SHI auf die Zellzyklusphasen von NZK-Zellen

3.3.1.1 ART induziert zelltypspezifisch einen G0/G1-Phase-Arrest

ART [20 μ M] induziert nach 48 h Behandlung in Caki-1 Zellen einen G0/G1-Phase-Arrest (Abbildung 29 a). In den parental Caki-1 Zellen steigt der Anteil der G0/G1-Phase-Zellen dabei signifikant auf 133,3 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100 %) an. Dies geht mit einer signifikanten Reduktion der S-Phase-Zellen auf 60,38 % der Ausgangszellen (100 %) einher. Der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase wird durch ART ebenfalls signifikant reduziert (90,48 % von 100 %) (Abbildung 29 a (parental)). Auch die Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen sprechen mit einem signifikanten Anstieg der Zellen in der G0/G1-Phase auf die ART-Behandlung an, hier auf 144,4 %. Anteilig sinkt der Prozentsatz der Zellen in der S- (44,45 %) und in der G2/M-Phase (63,49 %) (Abbildung 29 a (resistent)).

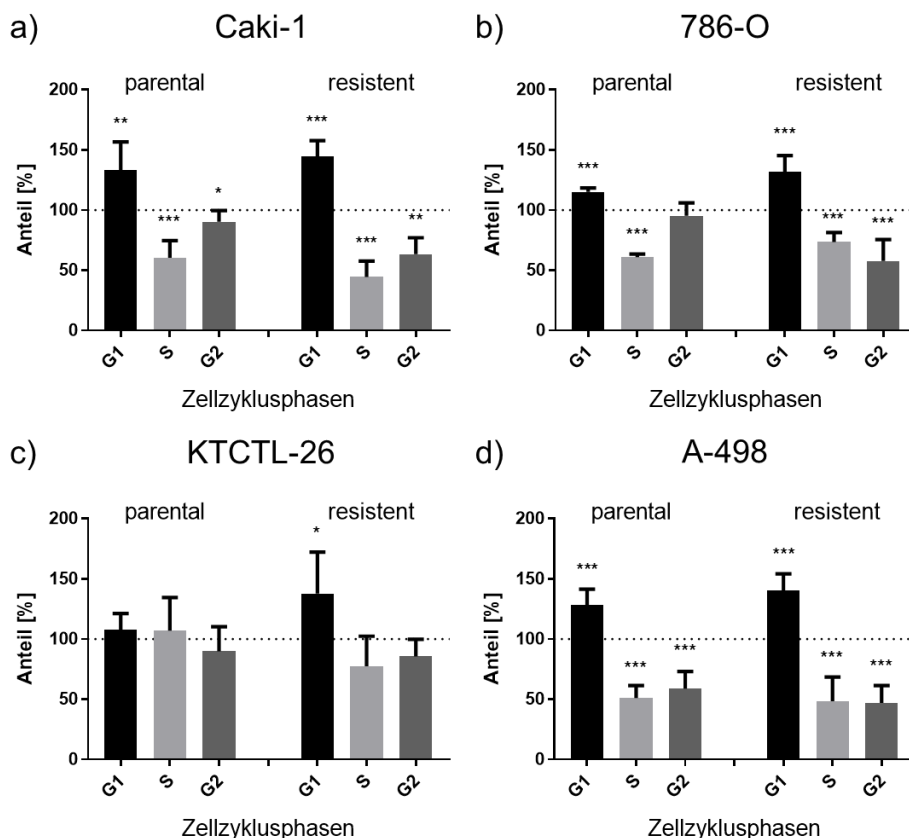


Abbildung 29: Veränderung der Zellzyklusphase der NZK-Zellen nach ART-Behandlung. Caki-1 (a), 786-O (b), KTCTL-26 (c) und A-498 (d) Zellen nach 48 h Behandlung mit ART [20 μ M]. Prozentualer Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen [%], normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle = 100 %. Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Auch bei den 786-O Zellen resultiert die ART-Gabe in einem G0/G1-Phase-Arrest (Abbildung 29 b). Die ART-Behandlung parentaler 786-O Zellen (Abbildung 29 b (parental)) mündet gleichzeitig in einer signifikanten Reduktion der S-Phase-Zellen (60,92 %). Der Anteil der G2/M-Phase-Zellen bleibt hingegen unverändert (Abbildung 29 b (parental)). In den Sunitinib-resistenten 786-O Zellen resultiert die ART-Behandlung in einer signifikanten Reduktion der S- (73,64 %) und G2/M-Phase-Zellen (57,75 %) (Abbildung 29 b (resistent)).

Wie in den bereits aufgeführten NZK-Zellen führt die Exposition mit ART in den Sunitinib-resistenten KTCTL-26 Zellen zu einem signifikanten Anstieg der G0/G1-Phase-Zellen (138 %) (Abbildung 29 c (resistent)). Die Inkubation von parentalen KTCTL-26 Zellen mit ART zeigt hingegen keine signifikanten Veränderungen der Zellzyklusphasen (Abbildung 29 c (parental)).

Auch parentale A-498 Zellen sprechen mit einem signifikanten Anstieg an Zellen in der G0/G1-Phase (128,3 %) und einer signifikanten Reduktion der Zellen in der S- (51,07 %) und G2/M-Phase (58,93 %) an (Abbildung 29 d (parental)). Die Sunitinib-resistente A-498 Zelllinie zeigt ein vergleichbares Bild, so führt die ART-Behandlung ebenso zu einem signifikanten Anstieg der Zellen in der G0/G1-Phase (140,3 %) unter signifikanter Reduktion der Zellen in der S- (48,34 %) und G2/M-Phase (46,86 %) (Abbildung 29 d (resistent)).

3.3.1.2 SHI kann zelltypspezifisch einen G0/G1- oder G2/M-Phase-Arrest induzieren

Die Behandlung von parentalen Caki-1 Zellen mit SHI mündet in einem signifikanten Anstieg von Zellen in der G0/G1-Phase (192,6 %) und einer signifikanten Reduktion der Zellen in der S- (55,75 %) und G2/M-Phase (56,87 %) (Abbildung 30 a (parental)). Sunitinib-resistente Zellen zeigen hingegen einen signifikanten Anstieg an Zellen in der G2/M-Phase (132,6 %) mit einer tendenziellen Reduktion an Zellen in der G0/G1-Phase (Abbildung 30 a (resistent)).

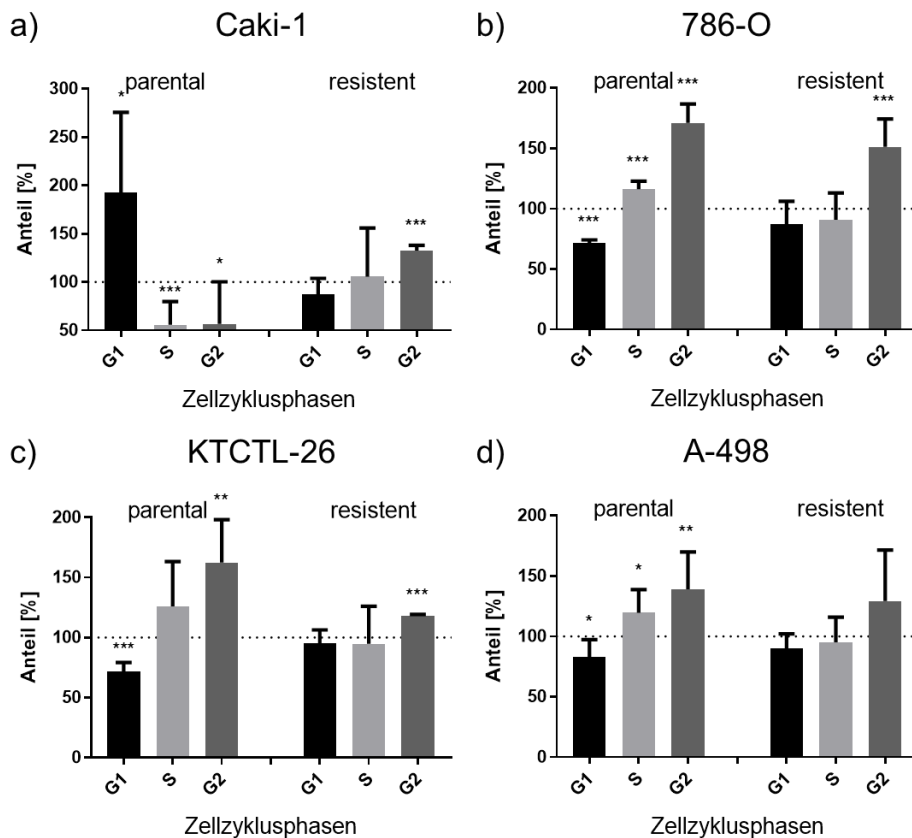


Abbildung 30: Veränderung der Zellzyklusphase der NZK-Zellen nach SHI-Behandlung. Caki-1 (a), 786-O (b), KTCTL-26 (c) und A-498 (d) Zellen nach 48 h Behandlung mit SHI [1,5 µM]. Prozentualer Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen [%], normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle = 100 %. Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Parentale (171,1 %) und Sunitinib-resistente (151,2 %) 786-O Zellen zeigen hingegen beide einen signifikanten G2/M-Phase-Arrest (Abbildung 30 b). Bei den parentalen 786-O Zellen ist zudem ein Anstieg an Zellen in der S-Phase (116,2 %) neben der signifikanten Reduktion an Zellen in der G0/G1-Phase (71,38 %) zu verzeichnen (Abbildung 30 b (parental)). Bei Sunitinib-resistenten 786-O Zellen ist hingegen nur eine tendenzielle Abnahme an Zellen in der G0/G1- (86,97 %) und S-Phase (90,85 %) zu erkennen (Abbildung 30 b (resistent)).

Bei den KTCTL-26 Zellen ist der G2/M-Phase-Arrest nur bei den parentalen Zellen (162,4 %) signifikant (Abbildung 30 c (parental)). Der Effekt geht mit einer signifikanten Reduktion an Zellen in der G0/G1-Phase (71,98 %) einher. Auch die Sunitinib-resistenten Zellen zeigen signifikant, wenn auch nicht ganz so deutlich wie die parentalen KTCTL-26 Zellen, einen Anstieg an Zellen in der G2/M-Phase (118,2 %). Dies korreliert mit einer tendenziellen Abnahme an Zellen in der G0/G1- und S-Phase (Abbildung 30 c (resistent)).

Auch die parentale A-498 Zelllinie weist eine signifikante Zunahme der Zellen in der G2/M-Phase (139,1 %) auf, die von einer signifikanten Abnahme an Zellen in der G0/G1-Phase (82,99 %) und einem signifikanten Anstieg an Zellen in der S-Phase (119,6 %) begleitet wird (Abbildung 30 d (parental)). Bei den Sunitinib-resistenten A-498 ist lediglich ein tendenzieller Anstieg an Zellen in der G2/M-Phase zu beobachten (129 %) (Abbildung 30 d (resistent)).

3.3.2 Molekulare Modulationen zellzyklusregulierender Proteine nach ART- oder SHI-Behandlung

Da Veränderungen in den Zellzyklusphasen mit Modulationen zellzyklusregulierender Proteine einhergehen, wurden diese quantitativ bestimmt. Für die vertiefenden Studien wurden dafür exemplarisch parentale und Sunitinib-resistente Caki-1 und 786-O Zellen herangezogen.

3.3.2.1 ART verändert die Expression zellzyklusregulierender Proteine

Die Behandlung von parentalen und Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen mit ART [20 µM] führt zu einer signifikanten Reduktion der zellzyklusregulierenden Proteine Cyclin A, Cyclin B, Cyclin-abhängige Kinase 1 (CDK1) und pCDK1 (Abbildung 31, Abbildung 32). CDK2 wird hingegen nur in den parentalen Zellen signifikant reduziert. pCDK2 ist nicht detektierbar (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren ist die Expression des Tumorsuppressors p27 durch ART in parentalen und Sunitinib-resistenten Zellen signifikant erhöht. p21 wird hingegen nicht signifikant reguliert (Abbildung 31, Abbildung 32).

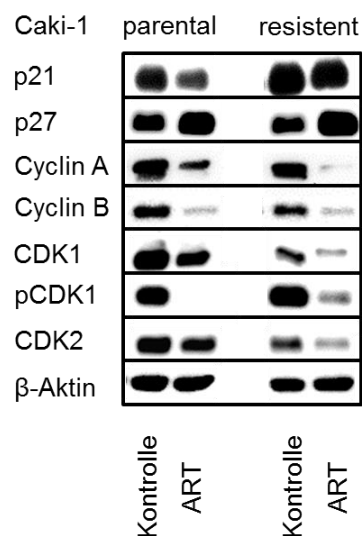


Abbildung 31: Zellzyklusregulierende Proteine nach ART-Behandlung in Caki-1 Zellen. Repräsentative Western-Blots aus $n = 4$ von parentalen und Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen für 48 h mit ART [20 µM] behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Proteinexpression von p21, p27, Cyclin A, Cyclin B, CDK1, pCDK1 und CDK2. β-Aktin diente als Beladungskontrolle.

Ergebnisse

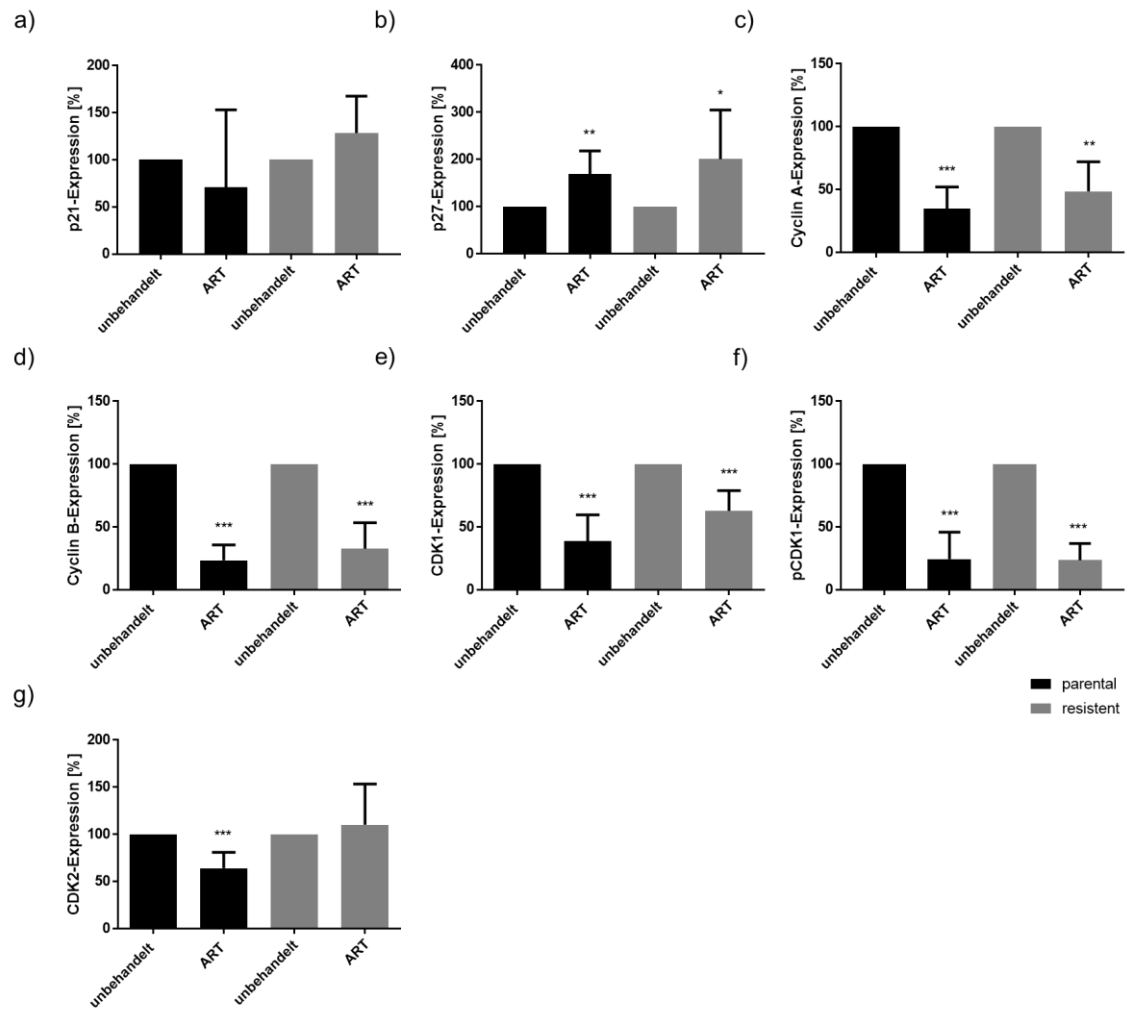


Abbildung 32: Zellzyklusregulierende Proteine nach ART-Behandlung in Caki-1 Zellen. Parentale und Sunitinib-resistente Caki-1 Zellen für 48 h mit ART [20 µM] behandelt. Pixelanalyse der Westen Blots von p21 (a), p27 (b), Cyclin A (c), Cyclin B (d), CDK1 (e), pCDK1 (f) und CDK2 (g). Expression in %. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (± SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 4.

Ergebnisse

In den parentalen und Sunitinib-resistenten 786-O Zellen liegen nach einer Behandlung mit ART [20 μ M] die Proteine Cyclin A, Cyclin B, CDK1, pCDK1 und p27 signifikant reduziert vor (Abbildung 33, Abbildung 34). Hingegen resultiert die Behandlung mit ART in Sunitinib-resistenten 786-O Zellen in einer erhöhten Expression von p21 (Abbildung 34 a (resistent)). Weder in parentalen noch in Sunitinib-resistenten 786-O Zellen werden CDK2 oder pCDK2 durch ART beeinflusst (Abbildung 34 g + h).

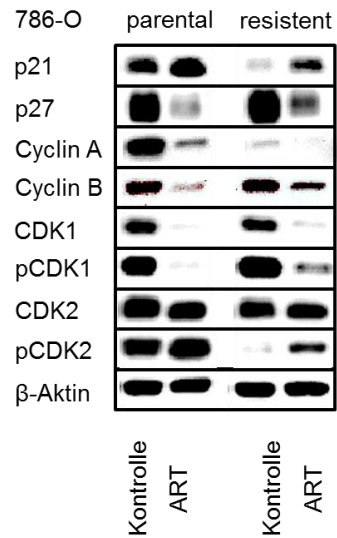


Abbildung 33: Zellzyklusregulierende Proteine nach ART-Behandlung in 786-O Zellen. Repräsentative Western-Blots aus $n = 4$ von parentalen und Sunitinib-resistenten 786-O Zellen für 48 h mit ART [20 μ M] behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Proteinexpression von p21, p27, Cyclin A, Cyclin B, CDK1, pCDK1, CDK2 und pCDK2. β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

Ergebnisse

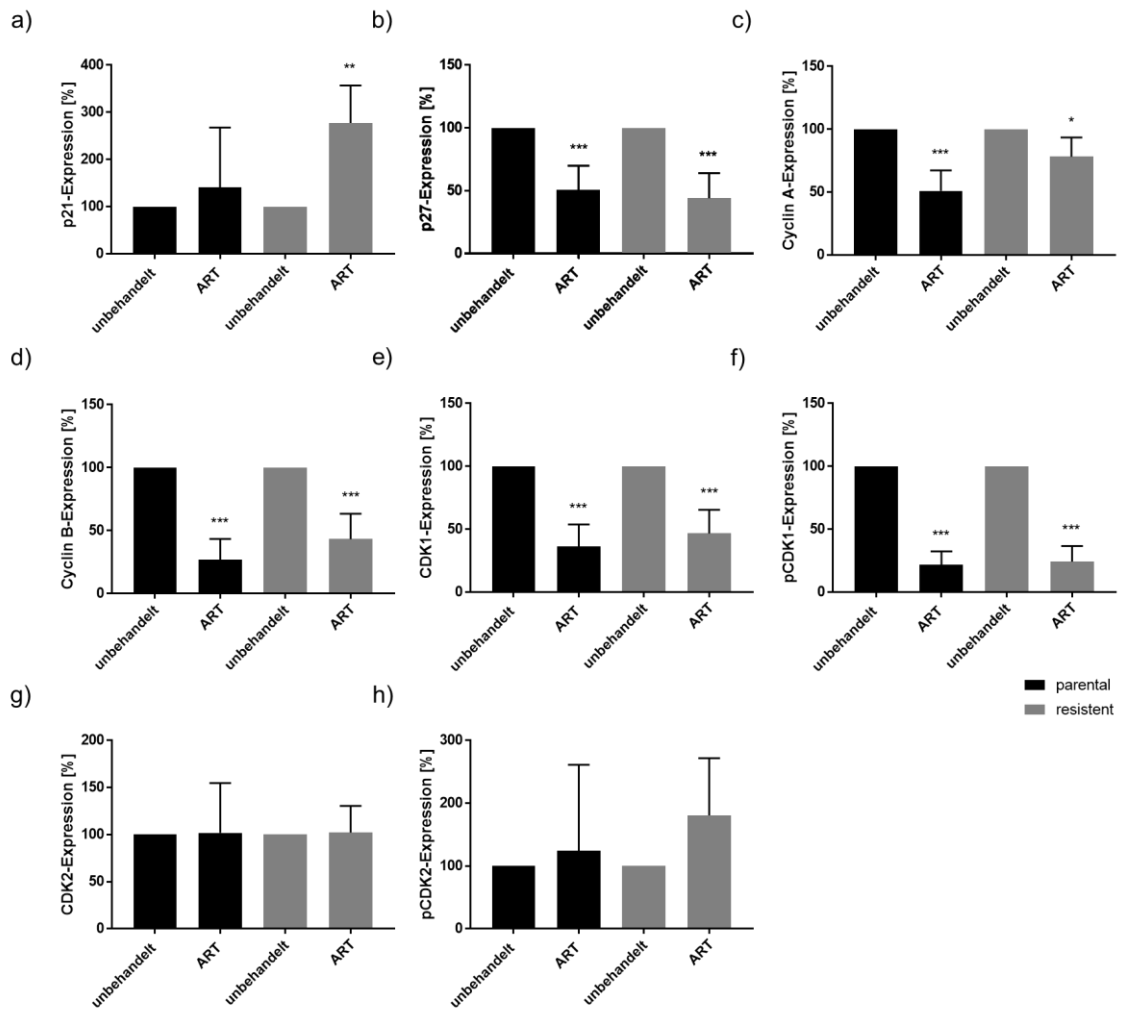


Abbildung 34: Zellzyklusregulierende Proteine nach ART-Behandlung in 786-O Zellen. Parentale und Sunitinib-resistente 786-O Zellen für 48 h mit ART [20 µM] behandelt. Pixelanalyse der Westen Blots von p21 (a), p27 (b), Cyclin A (c), Cyclin B (d), CDK1 (e), pCDK1 (f), CDK2 (g) und pCDK2 (h). Expression in %. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 4.

3.3.2.2 SHI verändert die Expression zellzyklusregulierender Proteine

Nach einer Behandlung von parentalen und Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen mit SHI [1 und 1,5 μ M] ist ebenfalls die Expression von Cyclin B und CDK1 sowie die Aktivität von CDK1 (pCDK1) signifikant reduziert (Abbildung 35, Abbildung 36). Dabei wird Cyclin B bei den parentalen Zellen bereits ab einer Gabe von 1 μ M SHI signifikant gehemmt (Abbildung 36 d (parental)). Sunitinib-resistente Zellen zeigen hingegen erst nach einer Gabe von 1,5 μ M SHI eine signifikante Abnahme von Cyclin B (Abbildung 36 d (resistent)). CDK1 und pCDK1 werden in den parentalen Caki-1 Zellen bereits nach einer Behandlung mit 1 μ M SHI signifikant inhibiert (Abbildung 36 e + f (parental)). Sunitinib-resistente Zellen sprechen auch hier erst ab 1,5 μ M SHI mit einer signifikanten Reduktion von CDK1 (28,77 %) und pCDK1 (72,43 %) an (Abbildung 36 e + f (resistent)). Alle anderen Proteine sind nicht signifikant moduliert.

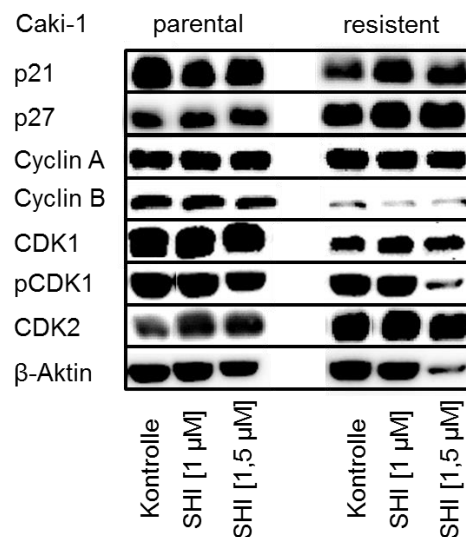


Abbildung 35: Zellzyklusregulierende Proteine nach SHI-Behandlung in Caki-1 Zellen Repräsentative Western-Blots aus $n = 4$ von parentalen und Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen für 48 h mit SHI [1 und 1,5 μ M] behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Proteinexpression von p21, p27, Cyclin A, Cyclin B, CDK1, pCDK1 und CDK2. β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

Ergebnisse

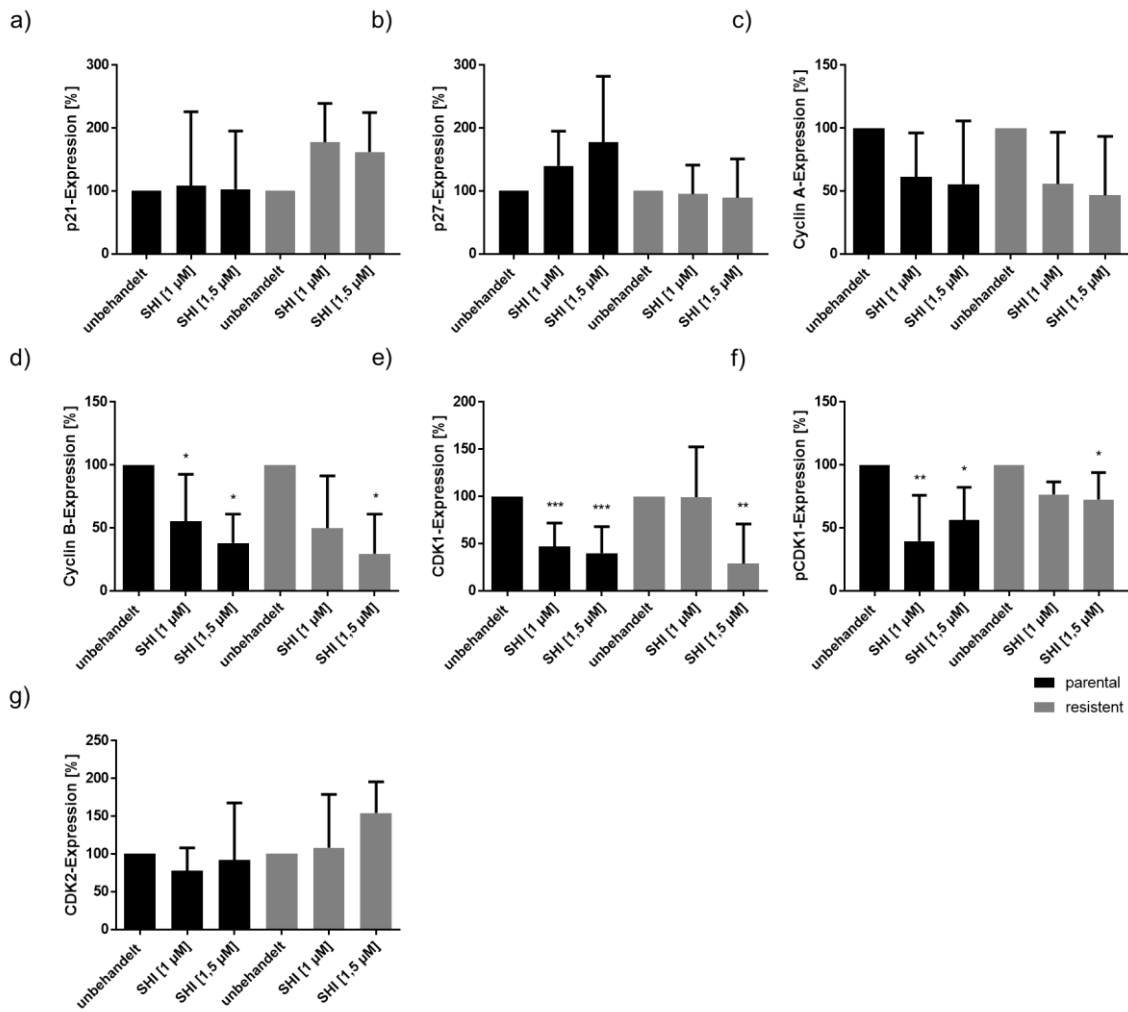


Abbildung 36: Zellzyklusregulierende Proteine nach SHI-Behandlung in Caki-1 Zellen. Parentale und Sunitinib-resistente Caki-1 Zellen für 48 h mit SHI [1 und 1,5 µM] behandelt. Pixelanalyse der Westen Blots von p21 (a), p27 (b), Cyclin A (c), Cyclin B (d), CDK1 (e), pCDK1 (f) und CDK2 (g). Expression in %. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 4.

Ergebnisse

In der Zelllinie 786-O führt die SHI-Behandlung zu einer Reduktion der Proteine Cyclin A und CDK1 bei parentalen und Sunitinib-resistenten Zellen. Cyclin A ist dabei erst ab einer Behandlung mit 1,5 μM SHI signifikant verringert (Abbildung 38 c). CDK1 liegt hingegen bereits nach Inkubation mit 1 μM SHI signifikant reduziert vor (Abbildung 38 e). Sunitinib-resistente 786-O Zellen sprechen auf SHI weiterhin mit einer signifikanten Reduktion von Cyclin B und einer gesteigerten Expression von CDK2 und pCDK2 an (Abbildung 37, Abbildung 38 (resistent)). Cyclin B wird dabei in Sunitinib-resistenten Zellen konzentrationsabhängig signifikant reduziert (Abbildung 38 d (resistent)). Ein signifikanter Anstieg des Proteins CDK2 und seiner phosphorylierten Form ist in Sunitinib-resistenten Zellen ab einer Konzentration von 1,5 μM SHI zu verzeichnen (Abbildung 38 g + h (resistent)). Zudem liegt p27 nach der Behandlung mit SHI nur bei parentalen 786-O Zellen signifikant reduziert vor (Abbildung 38 b (parental)).

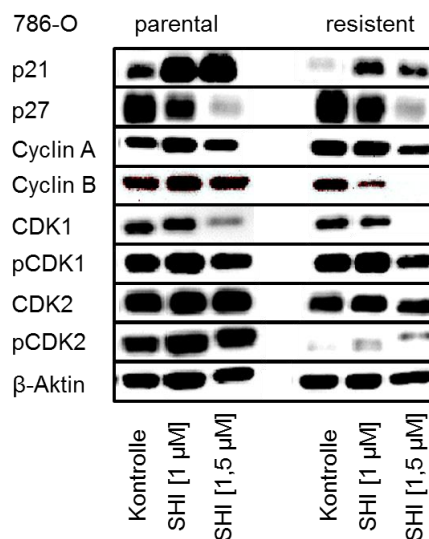


Abbildung 37: Zellzyklusregulierende Proteine nach SHI-Behandlung in 786-O Zellen Repräsentative Western-Blots aus $n = 4$ von parentalen und Sunitinib-resistenten 786-O Zellen für 48 h mit SHI [1 und 1,5 μM] behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Proteinexpression von p21, p27, Cyclin A, Cyclin B, CDK1, pCDK1 und CDK2. β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

Ergebnisse

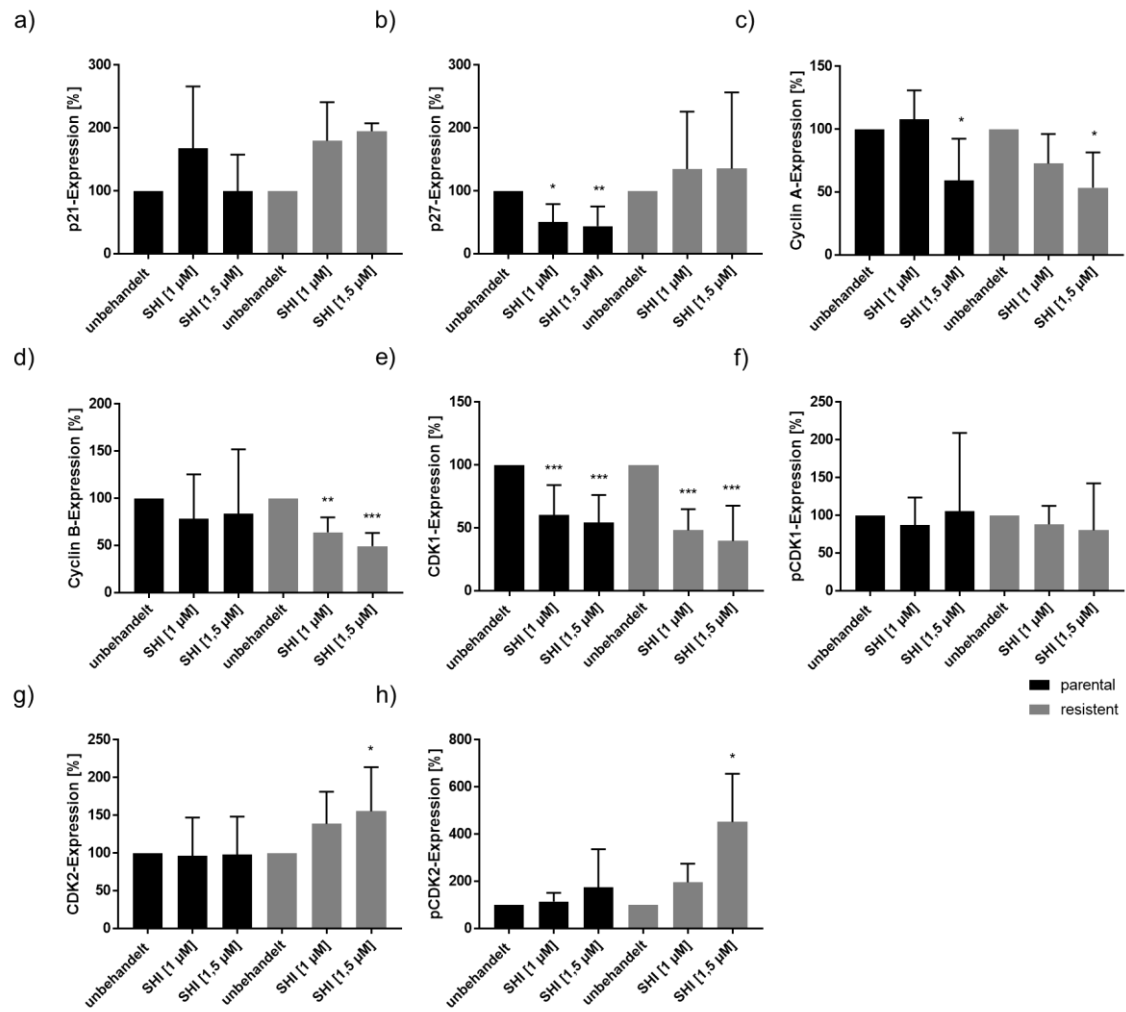


Abbildung 38: Zellzyklusregulierende Proteine nach SHI-Behandlung in 786-O Zellen. Parentale und Sunitinib-resistente 786-O Zellen für 48 h mit SHI [1 und 1,5 µM] behandelt. Pixelanalyse der Westen Blots von p21 (a), p27 (b), Cyclin A (c), Cyclin B (d), CDK1 (e), pCDK1 (f), CDK2 (g) und pCDK2 (h). Expression in %. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 4.

3.4 Induktion verschiedener Zelltodereignisse nach Behandlung mit ART oder SHI

Nicht in allen NZK-Zellen konnten die wachstumshemmenden Einflüsse von ART und SHI durch einen Zellzyklusarrest erklärt werden. Da die Wachstumsinhibition auch durch Zelltodereignisse induziert werden kann, wurden entsprechend Zelltod-Einflüsse von ART und SHI untersucht. Neben der Apoptose und Nekrose wurde unter Beteiligung spezifischer Inhibitoren der Einfluss von ART und SHI insbesondere auf die Ferroptose und Nekroptose analysiert. Auf molekularer Ebene wurden zudem die Expressionsprofile relevanter Zelltodproteine bestimmt.

3.4.1 Apoptose-Induktion nach ART- oder SHI-Behandlung

Insgesamt ist die Apoptoserate der parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen sehr gering und die 48-stündige Behandlung mit 20 μ M ART resultiert nur partiell in einem Anstieg apoptotischer Zellen (= Annexin V-positive Zellen; Abbildung 39 a – d).

Die Anzahl apoptotischer Sunitinib-resistenter Caki-1 Zellen ist dabei im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (= 100 %) signifikant auf 163,63 % erhöht (Abbildung 39 a (resistent)). Bei parentalen Caki-1 Zellen ist hingegen nur eine Tendenz in der Erhöhung der Apoptose auf 133 % zu erkennen (Abbildung 39 a (parental)). In parentalen 786-O Zellen wird nach Behandlung mit ART die Apoptose im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant inhibiert (Abbildung 39 b (parental)). Bei Sunitinib-resistenten 786-O Zellen ist tendenziell eine Reduktion erkennbar, diese ist jedoch nicht signifikant (74,30 %) (Abbildung 39 b (resistent)). In parentalen und Sunitinib-resistenten KTCTL-26 und A-498 Zellen resultiert die ART-Behandlung hingegen in keiner signifikanten Veränderung der apoptotischen Ereignisse (Abbildung 39 c + d). Die parentalen KTCTL-26 Zellen zeigen jedoch tendenziell eine gesteigerte Anzahl apoptotischer Zellen (Abbildung 39 c (parental)).

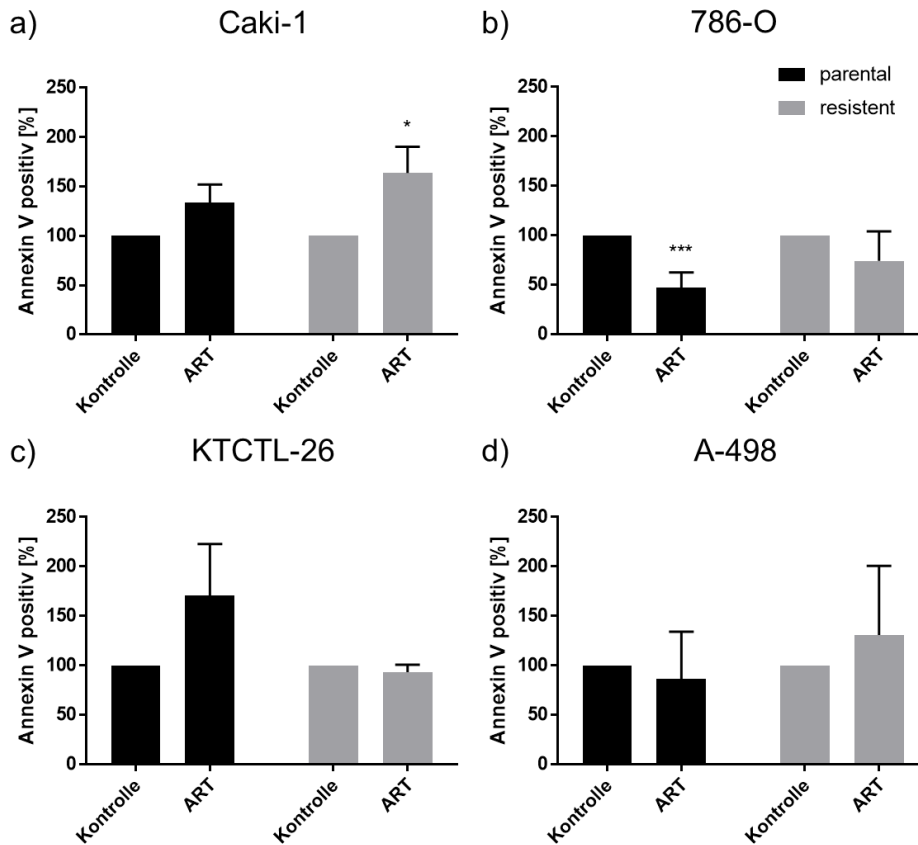


Abbildung 39: Apoptose - Annexin V-positive NZK-Zellen nach einer Behandlung mit ART. Parentale und Sunitinib-resistente Tumorzellen Caki-1 (a), 786-O (b), KTCTL-26 (c) und A-498 (d) über 48 h mit ART [20 µM] behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 3.

Die Behandlung mit SHI [1,5 µM] induziert einen signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen bei den Zelllinien Caki-1, 786-O und KTCTL-26 (Abbildung 40 a – c).

Die Behandlung von parentalen Caki-1 Zellen führt dabei zu einer signifikanten Verdopplung der Apoptoserate auf 211,91 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100 %) (Abbildung 40 a (parental)). Die Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen zeigen einen signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen auf 164,75 % (Abbildung 40 a (resistent)). 786-O Zellen sprechen ebenfalls durch eine signifikante Induktion der Apoptose auf SHI an (Abbildung 40 b). So steigt die Anzahl der Annexin V-positiven Zellen nach einer Behandlung mit SHI bei parentalen Zellen auf 192,67 % und bei Sunitinib-resistenten 786-O Zellen auf 229,76 % an. Parentale und Sunitinib-resistente KTCTL-26 Zellen zeigen die stärksten apoptotischen Effekte nach SHI-Gabe (Abbildung 40 c). Die Behandlung der parentalen Zellen resultiert in einer Verdopplung auf 235,91 % und die der Sunitinib-resistenten KTCTL-26 Zellen in einer Vervierfachung der apoptotischen Zellen (418,01 %). Keine signifikanten Änderungen sind hingegen bei A-498 Zellen nach Behandlung mit SHI zu detektieren (Abbildung 40 d).

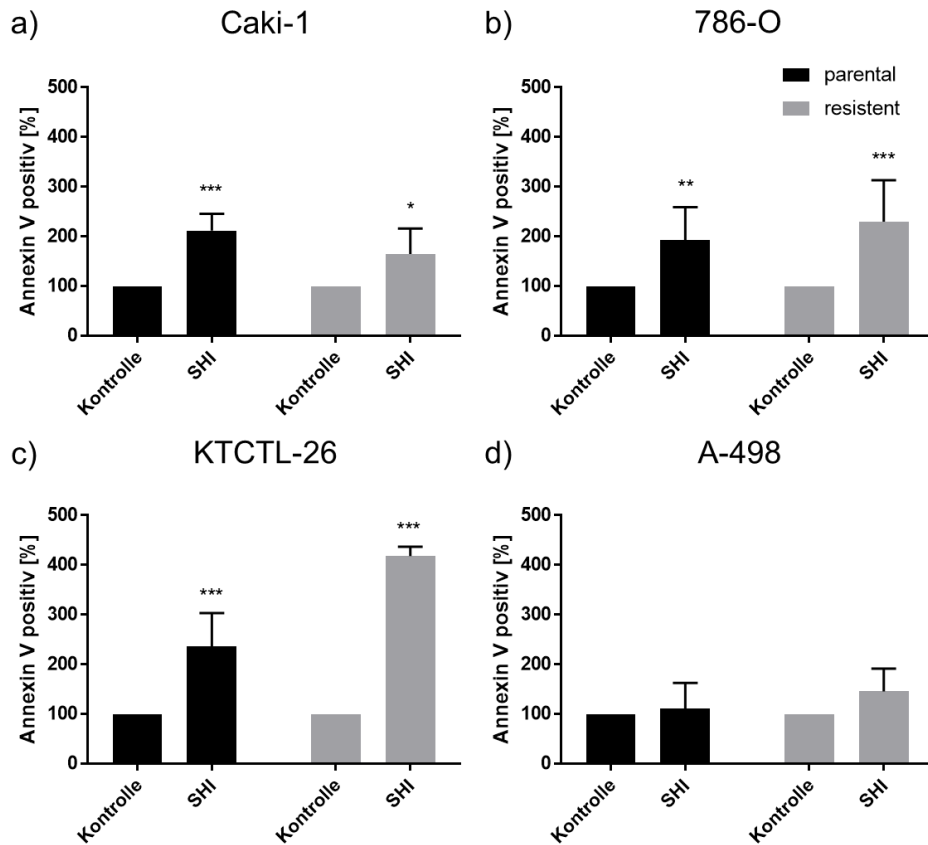


Abbildung 40: Apoptose - Annexin V-positive NZK-Zellen nach einer Behandlung mit SHI. Parentale und Sunitinib-resistente Tumorzellen Caki-1 (a), 786-O (b), KTCTL-26 (c) und A-498 (d) über 48 h mit SHI [1,5 µM] behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 3.

3.4.2 Ferroptose-Induktion nach ART-Behandlung

Für ART ist beschrieben, dass es die Ferroptose, einen eisenabhängigen, Caspase-unabhängigen Zelltod, induzieren kann (153). Mit einem Ferroptose-Inhibitor, dem Ferrostatin-1, sollten potenzielle ferroptotische Effekte durch ART auch beim NZK identifiziert werden (Abbildung 41 – Abbildung 44).

In den parental Caki-1 Zellen kann partiell eine signifikante Aufhebung der durch ART-induzierten Inhibition der Proliferation nach einer Inkubation von 48 h mit Ferrostatin-1 und einer Behandlung mit 20 und 50 µM ART nachgewiesen werden (Abbildung 41 b (parental)). Zu den anderen Zeitpunkten (24 und 72 h) kann kein solcher Effekt beobachtet werden. Auch die Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen sprechen nicht auf Ferrostatin-1 an. So führt hier die Kombinationsgabe aus ART und Ferrostatin-1 zu einem Zellwachstum, welches sich nicht signifikant von der Einzelbehandlung mit ART unterscheidet (Abbildung 41 a – c (resistent)).

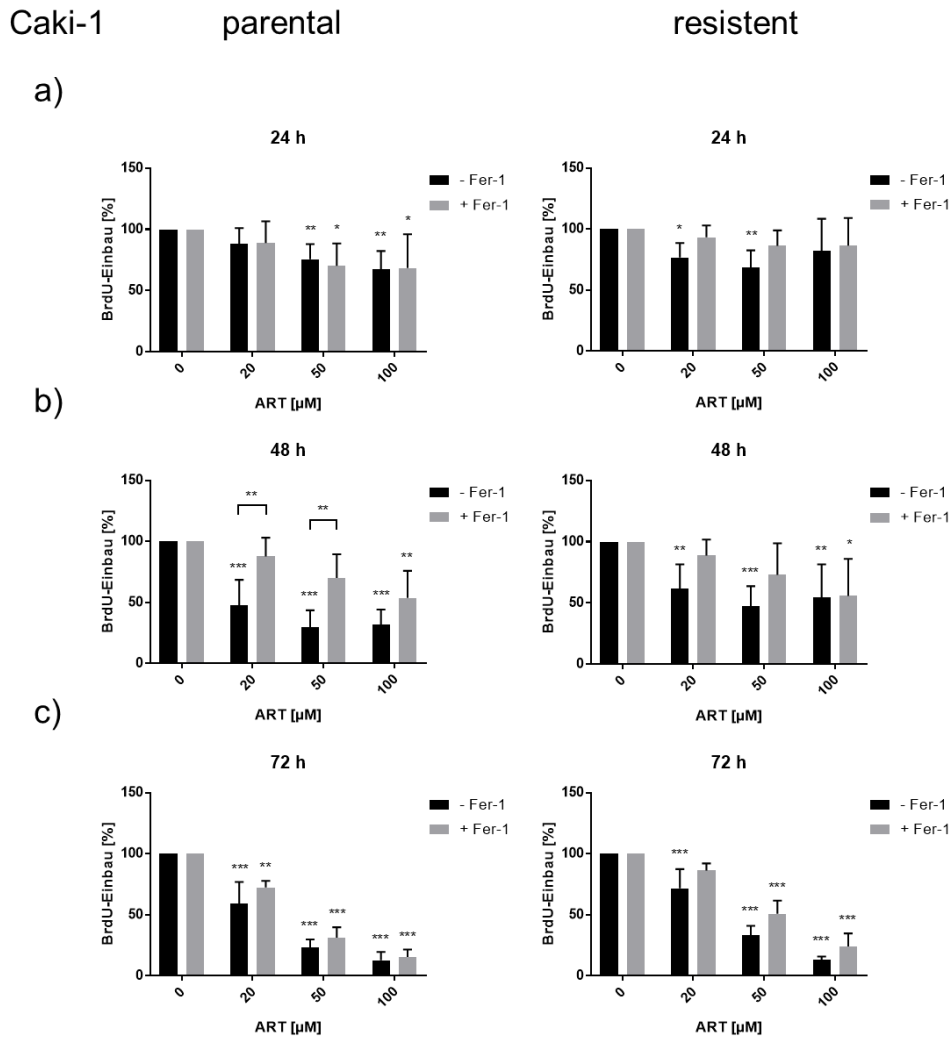


Abbildung 41: Ferroptose-Nachweis in Caki-1 Zellen nach ART-Behandlung. Nachweis der Aufhebung der ART-vermittelten Proliferationshemmung von Caki-1 Zellen durch Reversion ferroptischer Effekte mittels Ferroptose-Inhibitor Ferrostatin-1 (Fer-1). Behandelt wurden die parentalen (linksseitig) und Sunitinib-resistenten (rechtsseitig) Caki-1 mit ART [20, 50, 100 μM] allein oder in Kombination mit Ferrostatin-1 (Fer-1) [20 μM]. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrollen (= 100 %). BrdU-Test nach 24 h (a), 48 h (b) und 72 h (c) Behandlung. Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit Ausnahme der Klammern mit Sternchen, die einen signifikanten Unterschied zwischen ART und ART + Fer-1 behandelten Zellen zeigen: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 3.

In der Zelllinie 786-O vermag die Doppelbehandlung mit ART und Ferrostatin-1 nach 48 h partiell eine signifikante Aufhebung der proliferationshemmenden Effekte von ART [20 – 50 µM] zu induzieren (Abbildung 42 b). Dies gilt hier sowohl für die parentalen als auch Sunitinib-resistenten 786-O Zellen. Die Inkubation über 24 und 72 h zeigt hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen der ART-Mono- und Kombinationstherapie mit Ferrostatin-1 (Abbildung 42 a + c).

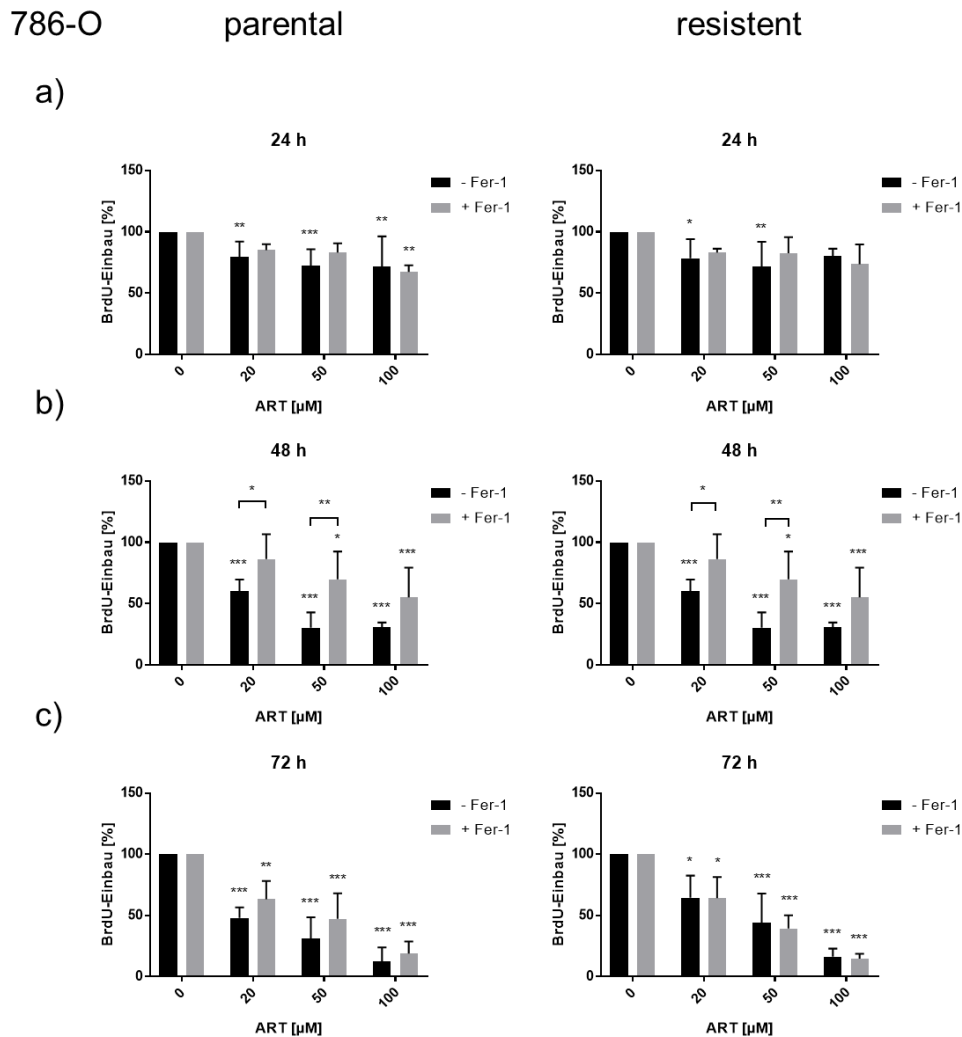


Abbildung 42: Ferroptose-Nachweis in 786-O Zellen nach ART-Behandlung. Nachweis der Aufhebung der ART-vermittelten Proliferationshemmung von 786-O Zellen durch Reversion ferroptotischer Effekte mittels des Ferroptose-Inhibitors Ferrostatin-1 (Fer-1). Behandelt wurden die parentalen (linksseitig) und Sunitinib-resistenten (rechtsseitig) 786-O mit ART [20, 50, 100 µM] allein oder in Kombination mit Ferrostatin-1 (Fer-1) [20 µM]. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrollen (= 100 %). BrdU-Test nach 24 h (a), 48 h (b) und 72 h (c) Behandlung. Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit Ausnahme der Klammern mit Sternchen, die einen signifikanten Unterschied zwischen ART und ART + Fer-1 behandelten Zellen zeigen: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 3.

Die parentalen und Sunitinib-resistenten KTCTL-26 Zellen zeigen hingegen eine signifikante Reversion der Proliferationshemmung nach kombinierter Gabe von ART und Ferrostatin-1 über den gesamten Inkubationszeitraum (Abbildung 43). Dabei kann die inhibitorische Wirkung von ART bei parentalen Zellen bereits nach 24 h Inkubation signifikant mit einer Konzentration von 50 und 100 μM ART in Kombination mit Ferrostatin-1 gestoppt und die Proliferation auf dem Level der Kontrollzellen gehalten werden (Abbildung 43 a (parental)). Auch Sunitinib-resistente Zellen zeigen ein ähnliches Ansprechen nach 24-stündiger Behandlung (Abbildung 43 a (resistent)). Weiterhin kann die starke Inhibition der Proliferation von parentalen KTCTL-26 Zellen durch ART über 48 h auf 47,55 % bei 20 μM , auf 14,99 % bei 50 μM und auf 13,93 % bei 100 μM durch die Kombination mit Ferrostatin-1 aufgehoben werden. In einem Wirkspektrum von 20 – 50 μM ART in Kombination mit Ferrostatin-1 entspricht die Proliferation der parentalen KTCTL-26 Zellen wieder dem Niveau der unbehandelten Zellen (100 %). Bei einer Behandlung mit 100 μM ART in Kombination mit Ferrostatin-1 kann der Inhibitor den starken inhibitorischen Effekt von ART in den parentalen KTCTL-26 nicht ganz ausgleichen (Reduktion auf 52,99 %), trotzdem ist die Proliferation im Vergleich zur ART-Monobehandlung signifikant weniger reduziert (Abbildung 43 b (parental)). Sunitinib-resistente KTCTL-26 Zellen zeigen ein ähnliches Ansprechen, jedoch ist der inhibitorische Effekt von ART weniger stark als bei den parentalen Zellen ausgeprägt (vgl. 3.2.2.1). Eine signifikante Gegenregulation durch die zusätzliche Gabe von Ferrostatin-1 ist hier ebenfalls zu beobachten (Abbildung 43 b (resistent)). Auch die Inkubation von parentalen und Sunitinib-resistenten KTCTL-26 Zellen über 72 h mündet in der Kombinationstherapie mit ART und Ferrostatin-1 in einer Zellproliferation, die der der unbehandelten Kontrollen entspricht (Abbildung 43 c). Die inhibierende Wirkung der ART-Monobehandlung nach 72 h ist dabei mit dem Inkubationszeitraum von 48 h vergleichbar (Abbildung 43 b + c) (vgl. 3.2.2.1).

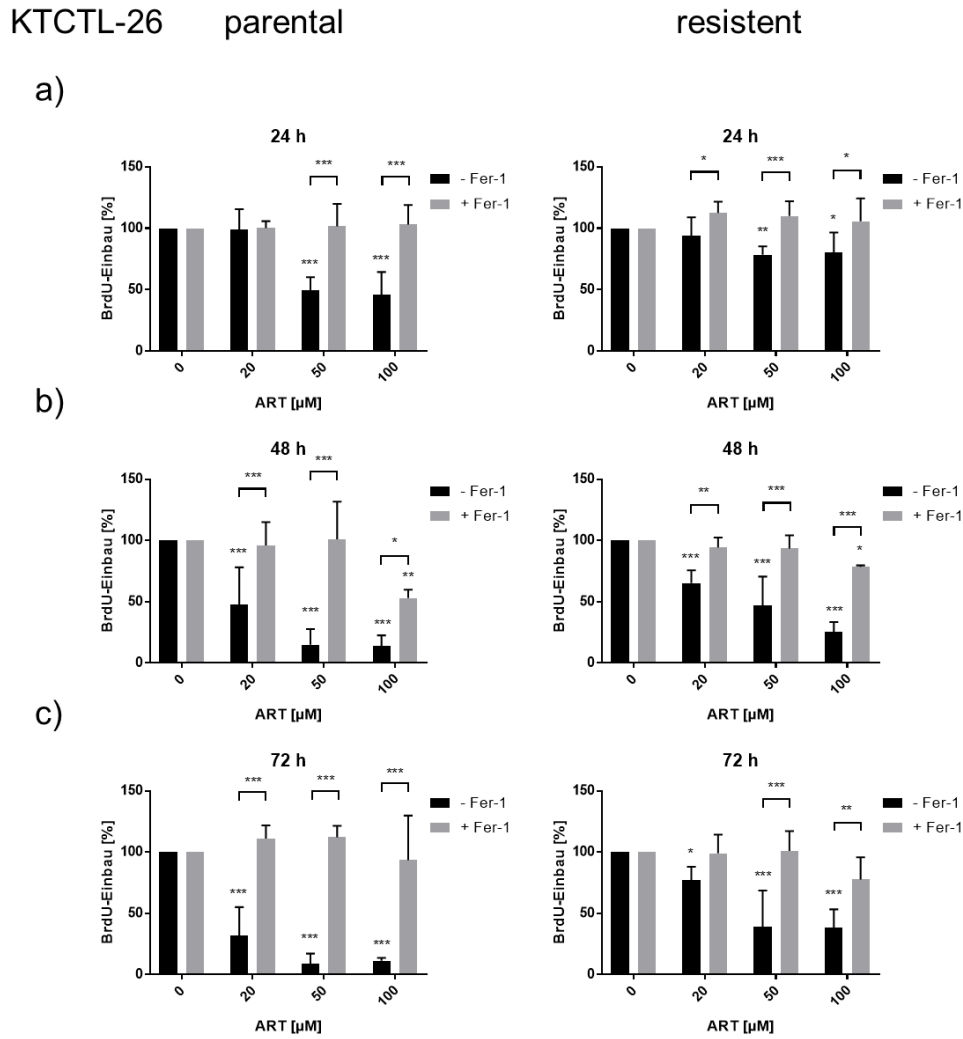


Abbildung 43: Ferroptose-Nachweis in KTCTL-26 Zellen nach ART-Behandlung. Nachweis der Aufhebung der ART-vermittelten Proliferationshemmung von KTCTL-26 Zellen durch Reversion ferroptotischer Effekte mittels des Ferroptose-Inhibitors Ferrostatin-1 (Fer-1). Behandelt wurden die parentalen (linksseitig) und Sunitinib-resistenten (rechtsseitig) KTCTL-26 mit ART [20, 50, 100 µM] allein oder in Kombination mit Ferrostatin-1 (Fer-1) [20 µM]. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrollen (= 100 %). BrdU-Test nach 24 h (a), 48 h (b) und 72 h (c) Behandlung. Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbeehandelten Kontrolle mit Ausnahme der Klammern mit Sternchen, die einen signifikanten Unterschied zwischen ART und ART + Fer-1 behandelten Zellen zeigen: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Im Kontrast dazu zeigt die Zelllinie A-498 in der Doppelbehandlung mit ART und Ferrostatin-1 keine Unterschiede gegenüber der ART-Monotherapie (Abbildung 44). Die Doppelbehandlung mit ART und Ferrostatin-1 kann zu keinem Zeitpunkt die Proliferationsinhibition durch ART aufheben (Abbildung 44 a – c). Dies deutet darauf hin, dass ART hier keine Ferroptose induziert.

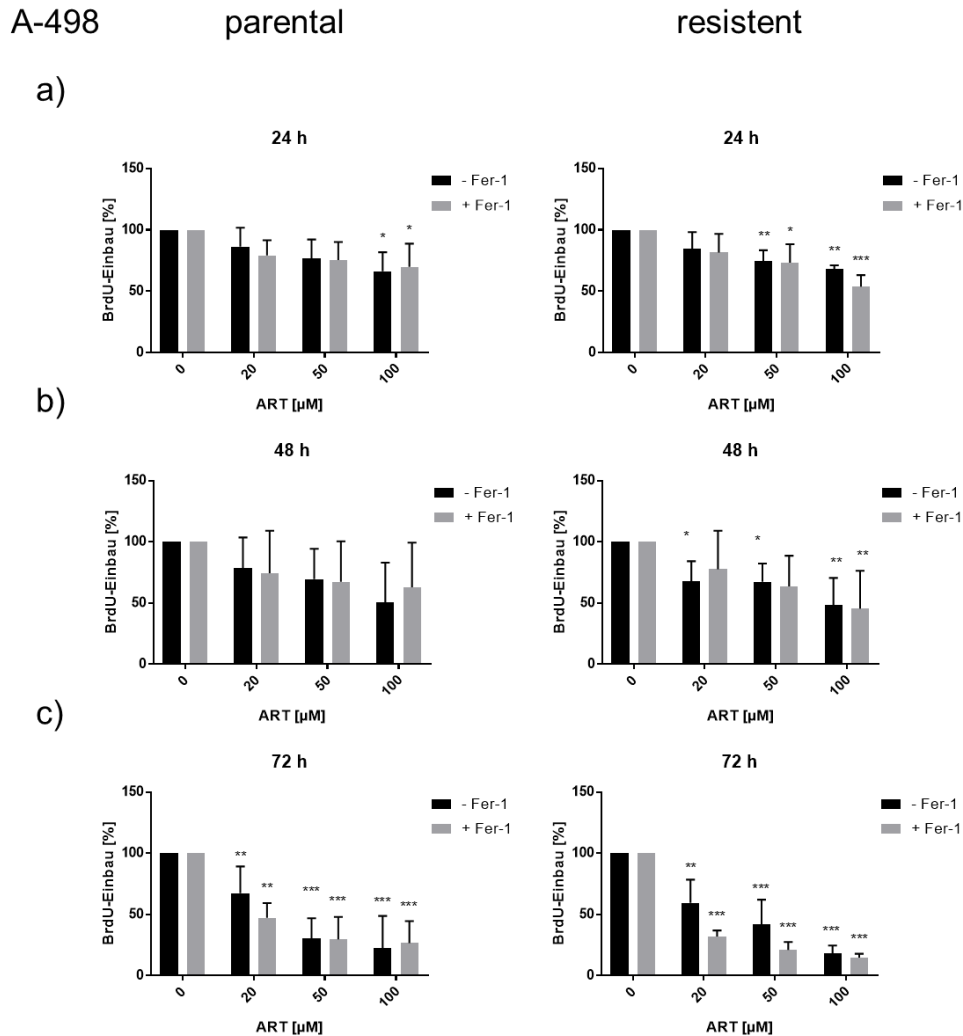


Abbildung 44: Ferroptose-Nachweis in A-498 Zellen nach ART-Behandlung. Nachweis der Aufhebung der ART-vermittelten Proliferationshemmung von A-498 Zellen durch Reversion ferroptotischer Effekte mittels des Ferroptose-Inhibitors Ferrostatin-1 (Fer-1). Behandelt wurden die parentalen (linksseitig) und Sunitinib-resistenten (rechtsseitig) A-498 mit ART [20, 50, 100 µM] allein oder in Kombination mit Ferrostatin-1 (Fer-1) [20 µM]. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrollen (= 100 %). BrdU-Test nach 24 h (a), 48 h (b) und 72 h (c) Behandlung. Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung ($\pm SD$). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit Ausnahme der Klammern mit Sternchen, die einen signifikanten Unterschied zwischen ART und ART + Fer-1 behandelten Zellen zeigen: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 3.

Insgesamt konnte somit insbesondere für die parentalen und Sunitinib-resistenten KTCTL-26 Zellen die Umkehrung der proliferationshemmenden Wirkung der ART-Behandlung durch Ferrostatin-1 und damit die Ferroptose-Induktion zu jedem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Die anderen Zelllinien zeigten keine oder nur partiell ferroptotische Effekte. Daher wurde die Zelllinie KTCTL-26 für die vertiefenden Versuchsreihen zur Ferroptose herangezogen. Dabei wurde zunächst der Einfluss von Eisen (Fe) in Form von holo-Transferrin in Kombination mit ART und Ferrostatin-1 getestet. Fe gilt als entscheidender Faktor für die Ferroptose. Durch die Kombinationsgabe von ART [50, 100 μ M] und Fe wird der Effekt von ART potenziert (Abbildung 45 a + b). Die additive Gabe von Ferrostatin-1 wirkt dem entgegen, die Proliferation entspricht hier wieder der Proliferation der unbehandelten Kontrollzellen.

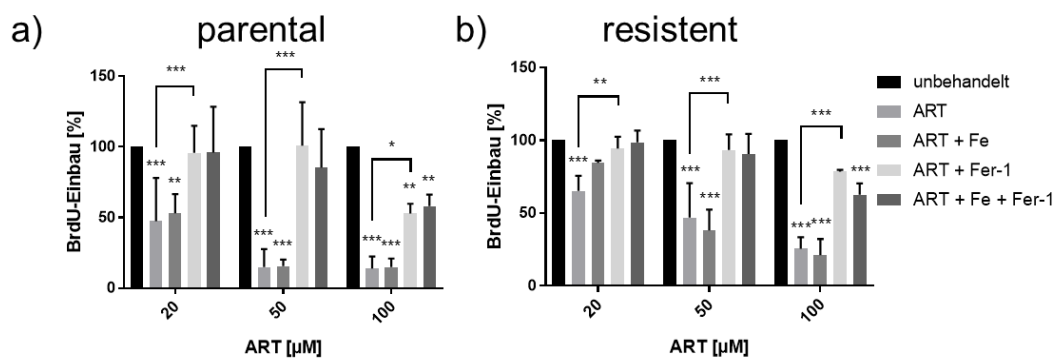


Abbildung 45: Der Einfluss von Eisen auf die ferroptotischen Ereignisse der KTCTL-26 Zellen. 48 h Inkubation der parentalen (a) und Sunitinib-resistenten (b) KTCTL-26 Zellen mit ART [20, 50, 100 μ M] alleine, mit einer Kombination aus ART + Fe (20 μ g/ml holo-Transferrin), mit ART + Fer-1 (Ferrostatin-1 [20 μ M]) oder mit ART + Fe + Fer-1. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit Ausnahme der Klammern mit Sternchen, die einen signifikanten Unterschied zwischen ART und ART + Fer-1 behandelten Zellen zeigen: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Ein wesentlicher Bestandteil der Ferroptose ist neben dem Eisenbedarf die Entstehung von ROS. Trolox, ein Antioxidans, sollte in einem weiteren Versuchsansatz freie Radikale binden und so seinerseits die Ferroptose-Induktion verhindern (Abbildung 46). Die Einzelbehandlung parentaler und Sunitinib-resistenter KTCTL-26 Zellen mit ART resultiert, wie zuvor, in einer signifikanten Proliferationsinhibition. In Kombination mit Trolox kann die Inhibition signifikant aufgehoben werden. Die Zellproliferation der KTCTL-26 ist in der Kombination von ART mit Trolox im Vergleich zur ART-Einzeltherapie signifikant angehoben und entspricht fast der Zellteilungsrate unbehandelter Zellen. So ist nach einer 20 μ M ART-Trolox-Behandlung bei den parentalen Zellen nur noch eine Verminderung der Proliferation auf 86,92 % (Abbildung 46 a) und bei den Sunitinib-resistenten Zellen auf 97,27 % (Abbildung 46 b) zu verzeichnen. Auch die stärkere Inhibition durch 50 μ M ART wird durch Trolox bei parentalen und bei Sunitinib-resistenten Zellen aufgehoben. Lediglich in der Behandlung mit der höchsten ART-Konzentration von 100 μ M ART kann die Kombination mit

Trolox einer signifikanten Inhibition der Proliferation durch ART bei parentalen Zellen nicht mehr vollständig entgegenwirken, ist dabei aber immer noch signifikant (Abbildung 46 a).

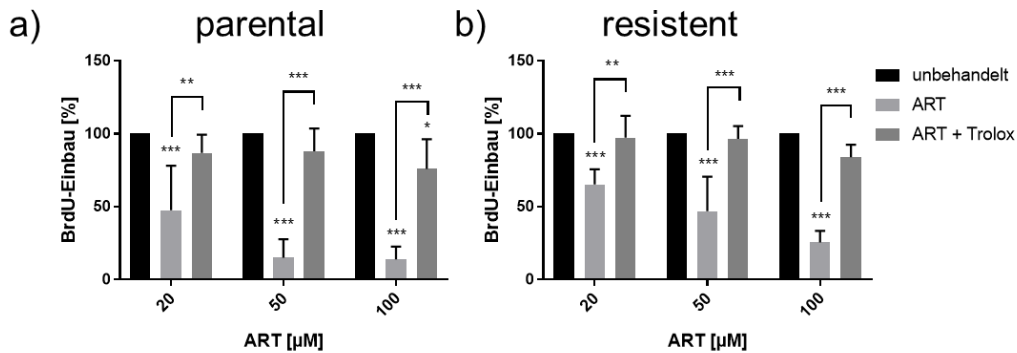


Abbildung 46: Beteiligung von ROS im Wirkmechanismus von ART in KTCTL-26 Zellen. Parentale (a) und Sunitinib-resistente (b) KTCTL-26 Zellen nach 48 h Behandlung mit ART [20, 50, 100 µM] oder mit ART + Trolox [0,5 mM]. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit Ausnahme der Klammern mit Sternchen, die einen signifikanten Unterschied zwischen ART und ART + Trolox behandelten Zellen zeigen: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Zum antioxidativen Schutzsystem von Zellen zählt das Tripeptid GSH, das in Anwesenheit von reaktivem Sauerstoff oxidiert als GSSG vorliegt. Das Absinken des GSH-Spiegels kann im Luciferase-Test bestimmt werden. Nach Behandlung mit ART ist ein signifikanter Abfall des GSH-Gehalts in den KTCTL-26 Zellen messbar (Abbildung 47). Der GSH-Gehalt fällt dabei in den parentalen Zellen auf 53,4 % und in den Sunitinib-resistenten KTCTL-26 Zellen auf 83 % ab. In der Kombination von ART mit Fe verstärkt sich dieser Effekt weiter signifikant. Hier sinkt der GSH-Gehalt der parentalen Zellen sogar auf 21,8 % und der Sunitinib-resistenten KTCTL-26 Zellen auf 68,2 %.

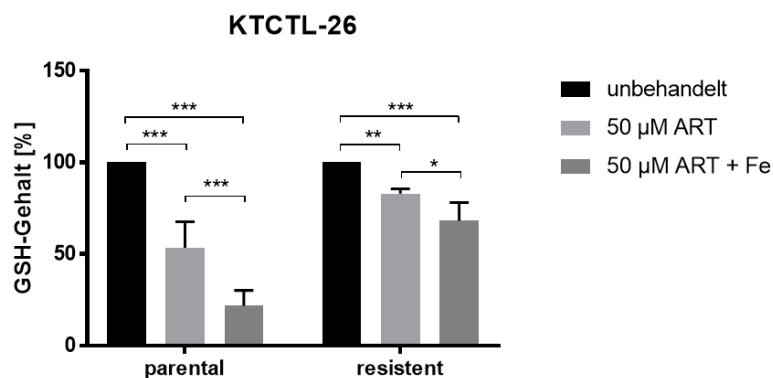


Abbildung 47: GSH-Gehalt der KTCTL-26 Zellen nach Behandlung mit ART. Parentale und Sunitinib-resistente KTCTL-26 Zellen nach 24 h mit ART [50 µM] allein oder in Kombination mit Fe (holo-Transferrin [20 µg/ml]) behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit Ausnahme der Klammern mit Sternchen, die einen signifikanten Unterschied zwischen ART und ART + Fe behandelten Zellen zeigen: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 3.

Wichtig für das antioxidative Schutzsystem ist auch die Peroxidase GPX4. GPX4 agiert dabei in Abhängigkeit von GSH beim Auftreten von Lipidhydroperoxiden und gilt insbesondere als Indikator für die Ferroptose. Die Expression des Proteins kann mittels Western-Blot-Analyse detektiert werden. Die Behandlung mit ART [50 µM] führt zu einer signifikanten Reduktion von GPX4 sowohl in den parental (42,2 %) als auch Sunitinib-resistenten (48,59 %) KTCTL-26 Zellen (Abbildung 48 a + b).

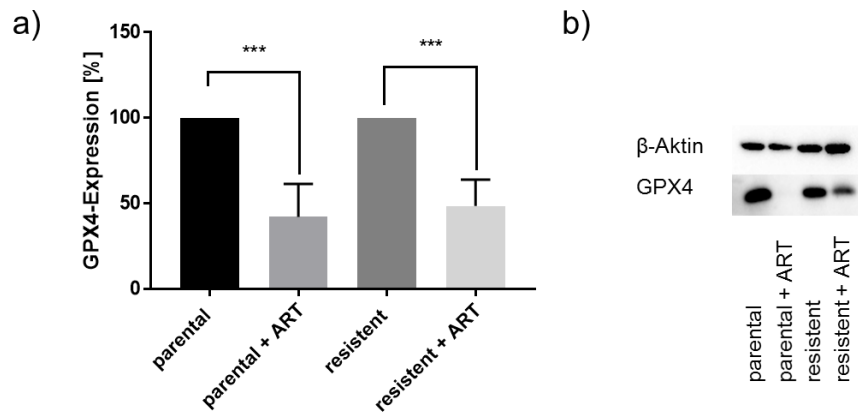


Abbildung 48: GPX4-Expression in den KTCTL-26 Zellen nach ART-Behandlung. Parentale und Sunitinib-resistente KTCTL-26 Zellen nach 48 h ART-Behandlung [50 µM]. Pixelanalyse (Western-Blot-Analyse) der GPX4-Expression in % (a). Repräsentativer Western-Blot (b). Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Auch morphologisch ist eine Veränderung der Zellen durch ART unter dem Lichtmikroskop zu erkennen (Abbildung 49). So sind bei parentalen Zellen ein Aufblähen des Zellkörpers und Ausstülpungen/Defekte der Membran nach ART-Behandlung erkennbar (Abbildung 49 a, rechts).

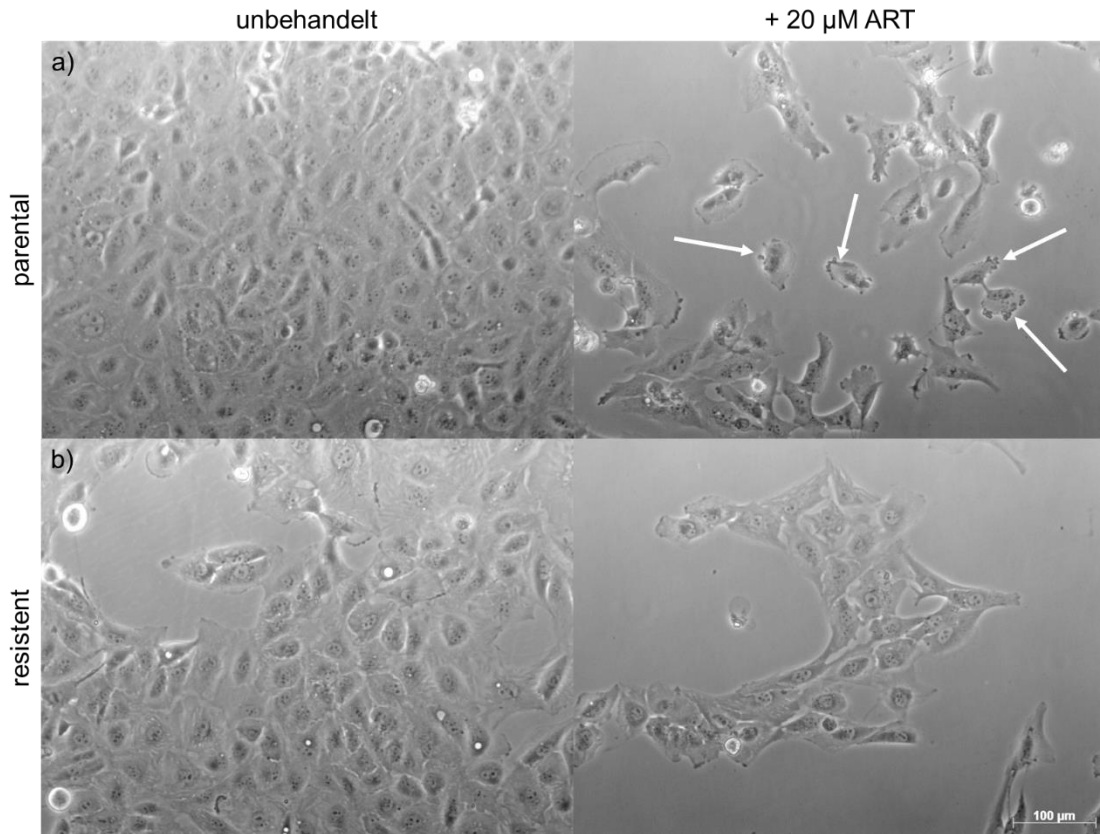


Abbildung 49: Mikroskopische Aufnahmen mit ART behandelter KTCTL-26 Zellen. Parentale (a) und Sunitinib-resistente (b) KTCTL-26 Zellen über 48 h mit ART [20 µM] (rechts) behandelt gegenüber unbehandelten KTCTL-26 Zellen (links). Pfeil: morphologische Veränderungen der Zellmembran. 100 x Vergrößerung.

3.4.3 Nekroptose-Induktion nach SHI-Behandlung

Die Nekroptose oder auch geregelte Nekrose ist ein RIP1-induzierter alternativer Zelltodmechanismus. Studien sprechen dafür, dass SHI die Nekroptose induzieren kann (177, 205, 206). Inwiefern dies bei NZK-Zelllinien geschieht, sollte mittels eines spezifischen RIP1-Inhibitors, Necrostatin-1, getestet werden. Die Bestimmung des Zellwachstums zeigt bereits die inhibitorische Wirkung von SHI auf die verwendeten Tumorzelllinien. Die Behandlung mit Necrostatin-1 allein hat in allen Zelllinien eine eher stimulierende Wirkung auf das Zellwachstum, sogar signifikant im Inkubationszeitraum von 24 bis 48 h bei SHI-unbehandelten parentalen und Sunitinib-resistenten Zellen. In Kombination mit SHI vermag Necrostatin-1 dessen inhibitorische Effekte, in Abhängigkeit von der SHI-Konzentration, aufzuheben. Die Wirkung umfasst alle getesteten Zelllinien und ist abhängig von der Inkubationszeit und Konzentration von SHI. Die Wirkung von Necrostatin-1 nimmt jedoch insgesamt über den Inkubationszeitraum ab (Abbildung 50 – Abbildung 53).

Die Einzeltherapie mit SHI führt bei parentalen Caki-1 Zellen zu einem signifikanten Abfall des Zellwachstums ab 1 μM SHI auf 71,72 % nach 24 h Inkubation (Abbildung 50 a (parental)). Die Kombination mit Necrostatin-1 hebt diesen Effekt hingegen auf und führt, in Abhängigkeit von der SHI-Konzentration, sogar partiell zu einer Wachstumsstimulation bis 1 μM SHI auf 116,83 %. Sunitinib-resistente Zellen zeigen einen ähnlichen Verlauf, mit dem Unterschied, dass SHI bereits ab 0,5 μM eine signifikante Wachstumsinhibition (88,71 %) aufweist (Abbildung 50 a (resistent)). Ab einer Konzentration von 1,5 μM SHI in Kombination mit Necrostatin-1 ist das Zellwachstum im Vergleich zur Einzelgabe mit SHI zwar signifikant gesteigert, allerdings kann Necrostatin-1 die Wachstumshemmung von SHI nicht mehr vollständig revertieren (82,46 %). Dennoch wird die Wirkung von SHI im Vergleich zur Einzelgabe mit Necrostatin-1 signifikant aufgehoben (Abbildung 50 a (resistent)). Nach 48-stündiger Inkubation hebt Necrostatin-1 bei parentalen Zellen nur noch bis zu einer Konzentration von 1,5 μM SHI den inhibitorischen Effekt (27,74 %) im Vergleich zur Einzelbehandlung (10,74 %) signifikant auf (Abbildung 50 b (parental)). Auch wenn die Wirkung von SHI nach 24-stündiger Inkubation bei Sunitinib-resistenten Zellen stärker ausgeprägt ist, zeigen parentale Zellen eine höhere Sensitivität auf SHI mit zunehmender Inkubationszeit (Abbildung 50 b + c). Wie eingangs beschrieben, nimmt die Wirkung von Necrostatin-1 in den parentalen und Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen über die Zeit ab (Abbildung 50 a – c).

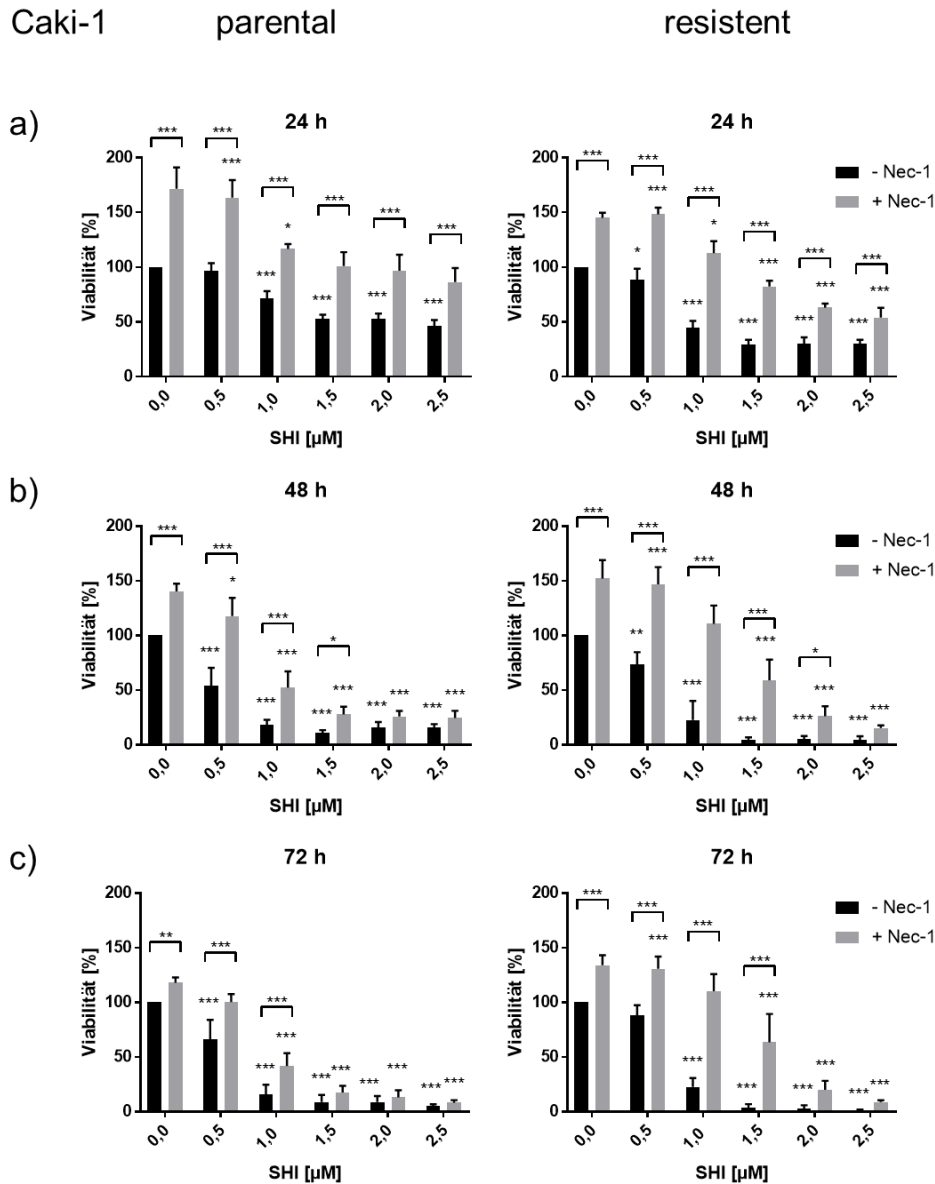


Abbildung 50: Nekroptose-Nachweis in Caki-1 Zellen nach SHI-Behandlung. Wachstum (MTT) parentaler (linksseitig) und Sunitinib-resistenter (rechtsseitig) Caki-1 Zellen für 24 h (a), 48 h (b) und 72 h (c) mit SHI [0,5 – 2,5 µM] allein oder in Kombination mit Necrostatin-1 (Nec-1) [80 µM], einem Nekroptose-Inhibitor, behandelt. Viabilität = Zellwachstum. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (= 100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit Ausnahme der Klammern mit Sternchen, die einen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten und mit Necrostatin-1 behandelten Zellen zeigen: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Auch bei der Zelllinie 786-O (Abbildung 51 a – c) kann die zusätzliche Gabe von Necrostatin-1 zu SHI dessen inhibitorische Wirkung signifikant reduzieren. Dies ist bei parentalen und Sunitinib-resistenten Zellen nach 24 h Inkubation (Abbildung 51 a) bis zu einer SHI-Konzentration von 2 µM, nach 48 h bis 1 µM (Abbildung 51 b) und nach 72 h nur bei Sunitinib-resistenten bis 0,5 µM der Fall (Abbildung 51 c (resistent)). Die zusätzliche Necrostatin-1 Behandlung zeigt nach einer 24 h Inkubation bis zu einer SHI-Konzentration von 1 µM sowohl bei parentalen Zellen (110,43 %) als auch bei Sunitinib-resistenten Zellen (116,06 %) ein gesteigertes bis normales Zellwachstum (Abbildung 51 a). Die

Einzelbehandlung mit SHI reduziert hingegen das Zellwachstums von parentalen Zellen und Sunitinib-resistenten Zellen um ca. 50 %. Nach 48 h ist der Effekt lediglich bis zu einer Konzentration von 0,5 μM SHI zu erkennen. So wird die Inhibition parentaler Zellen bei dieser Konzentration in der Einzelbehandlung auf 67,85 % und bei Sunitinib-resistenten auf 72,34 % reduziert (Abbildung 51 b). Die Doppelbehandlung mit Necrostatin-1 führt hingegen bei parentalen Zellen zu einem normalen Wachstum (91,17 %) und bei Sunitinib-resistenten Zellen zu einer Wachstumssteigerung auf 145,35 %. Nach 72 h Inkubation ist der Effekt einer zusätzlichen Necrostatin-1-Gabe nicht mehr signifikant messbar (Abbildung 51 c).

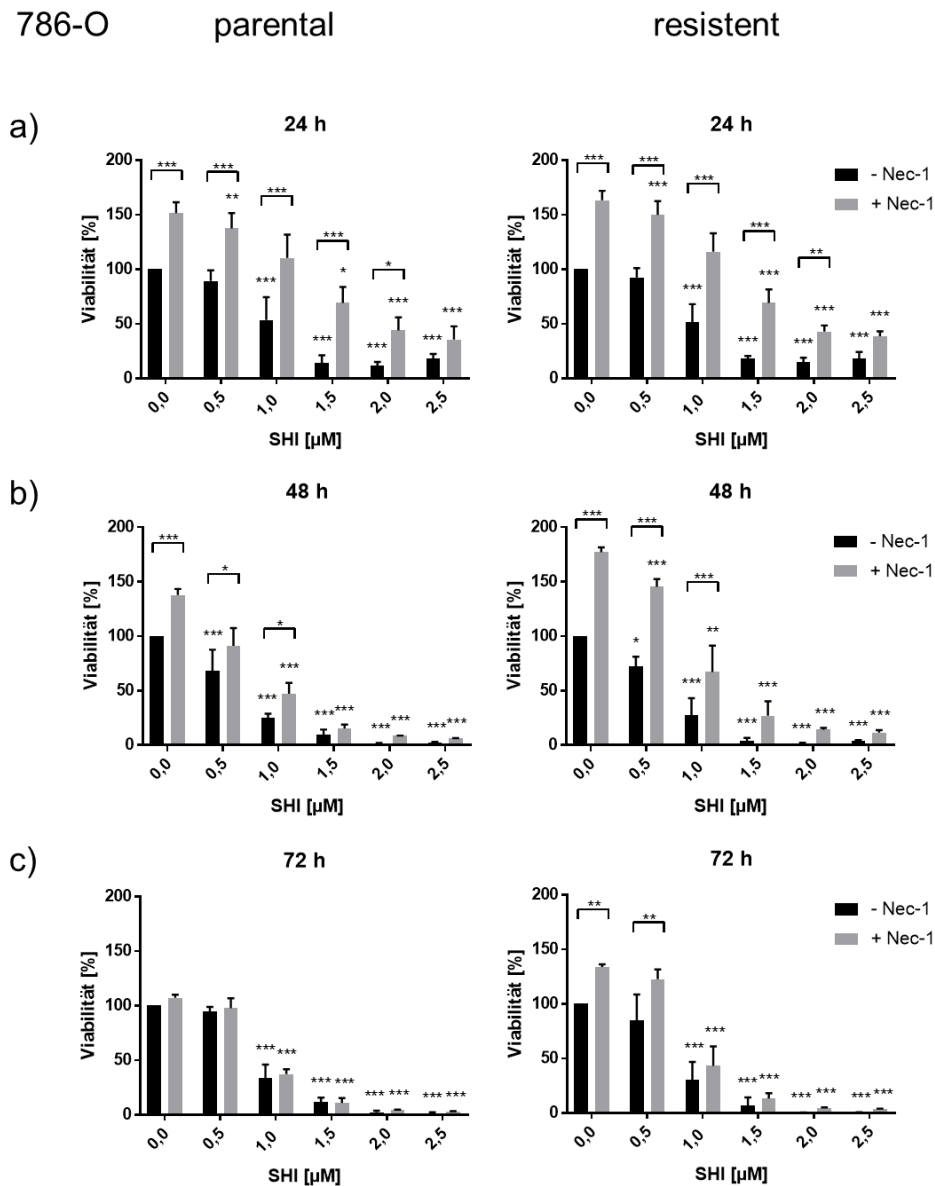


Abbildung 51: Nekroptose-Nachweis in 786-O Zellen nach SHI-Behandlung. Wachstum (MTT) parentale (linksseitig) und Sunitinib-resistenter (rechtsseitig) 786-O Zellen für 24 h (a), 48 h (b) und 72 h (c) mit SHI [0,5 – 2,5 μM] allein oder in Kombination mit Necrostatin-1 (Nec-1) [80 μM], einem Nekroptose-Inhibitor, behandelt. Viabilität = Zellwachstum. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (= 100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit Ausnahme der Klammern mit Sternchen, die einen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten und mit Necrostatin-1 behandelten Zellen zeigen: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Die Einzelbehandlung mit SHI mündet, wie beschrieben, in einer signifikanten Reduktion des Wachstums von KTCTL-26 Zellen über das gesamte Wirkspektrum und die verschiedenen Inkubationszeiten (Abbildung 52 a – c). Ab einer Konzentration von 1 μM SHI setzt nach Inkubation über 24 h eine signifikante Reduktion des Zellwachstums ein. Das Wachstum parentaler Zellen wird auf ca. 70,9 % und Sunitinib-resistenter KTCTL-26 Zellen auf 57,2 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reduziert. Die zusätzliche Gabe von Necrostatin-1 führt zu diesem Zeitpunkt zu einem gesteigerten oder gleichen Zellwachstum von parentalen KTCTL-26 Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 52 a (parental)). Bei Sunitinib-resistenten KTCTL-26 Zellen ist dieser wachstumssteigernde Effekt von Necrostatin-1 bis zu einer Konzentration von 1 μM SHI zu beobachten (112,95 %). Ab 1 μM SHI + Necrostatin-1 ist das Zellwachstum zwar inhibiert im Vergleich zur SHI-Einzeltherapie, jedoch signifikant erhöht (Abbildung 52 a (resistent)). Nach 48 h Inkubation zeigt die Necrostatin-1-Gabe bei parentalen und Sunitinib-resistenten Zellen nur bis zu einer Konzentration von 0,5 μM SHI ein Zellwachstum, dass mindestens dem der unbehandelten Kontrolle entspricht (parental: 120,89 % / resistent: 112,13 %) (Abbildung 52 b). Das Wachstum bleibt dennoch bis 1 μM SHI + Necrostatin-1 im Vergleich zur alleinigen SHI-Behandlung (parental: 34,60 % / resistent: 15,28 %) für parentale und Sunitinib-resistente KTCTL-26 Zellen signifikant gesteigert (parental: 70,91 % / resistent: 48,22 %). Der Verlauf ist auf den Inkubationszeitraum von 72 h übertragbar (Abbildung 52 c).

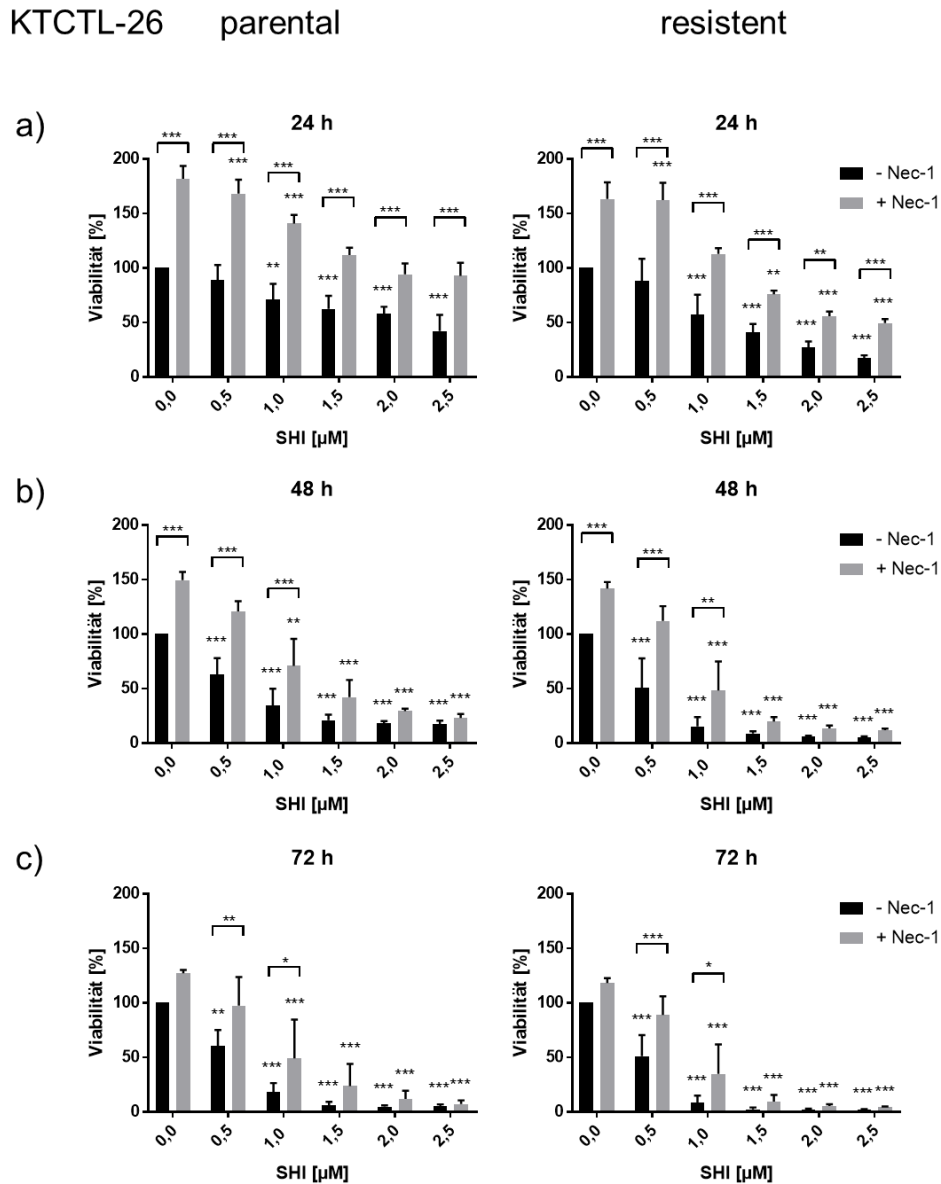


Abbildung 52: Nekroptose-Nachweis in KTCTL-26 Zellen nach SHI-Behandlung. Wachstum (MTT) parentaler (linksseitig) und Sunitinib-resistenter (rechtsseitig) KTCTL-26 Zellen für 24 h (a), 48 h (b) und 72 h (c) mit SHI [0,5 – 2,5 µM] allein oder in Kombination mit Necrostatin-1 (Nec-1) [80 µM], einem Nekroptose-Inhibitor, behandelt. Viabilität = Zellwachstum. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (= 100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit Ausnahme der Klammern mit Sternchen, die einen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten und mit Necrostatin-1 behandelten Zellen zeigen: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Die Zelllinie A-498 zeigt eine signifikante Inhibition des Wachstums nach 24 h Inkubation mit SHI (Abbildung 53). Für parentale Zellen wird das Wachstum dabei ab einer Konzentration von 1 µM SHI auf 84,53 % und für Sunitinib-resistente Zellen ab einer Konzentration von 1,5 µM SHI auf 73,24 % signifikant reduziert (Abbildung 53 a). Die Kombination mit Necrostatin-1 führt dazu, dass das Zellwachstum wieder vergleichbar mit dem der unbehandelten Kontrollen ist. Nach 48-stündiger Inkubation mit SHI (Abbildung 53 b) ist das Zellwachstum ab einer Konzentration von 1 µM für parentale (79,1 %) und Sunitinib-resistente Zellen (73,68 %) signifikant inhibiert. Die Kombination mit Necrostatin-1 hebt

diesen Effekt für parentale Zellen bis zu einer SHI-Konzentration von 1,5 μM und für Sunitinib-resistente Zellen bis 2 μM SHI vollständig auf. Nach einer 72 h Behandlung (Abbildung 53 c) mit bis zu 2 μM SHI entspricht das Zellwachstum in Kombination mit Necrostatin-1 für parentale und Sunitinib-resistente Zellen mindestens dem der unbehandelten Kontrolle. Insgesamt kann mit Necrostatin-1 der wachstumshemmende Effekt von SHI über alle Zeitpunkte und Konzentrationen signifikant aufgehoben werden (Abbildung 53 a – c).

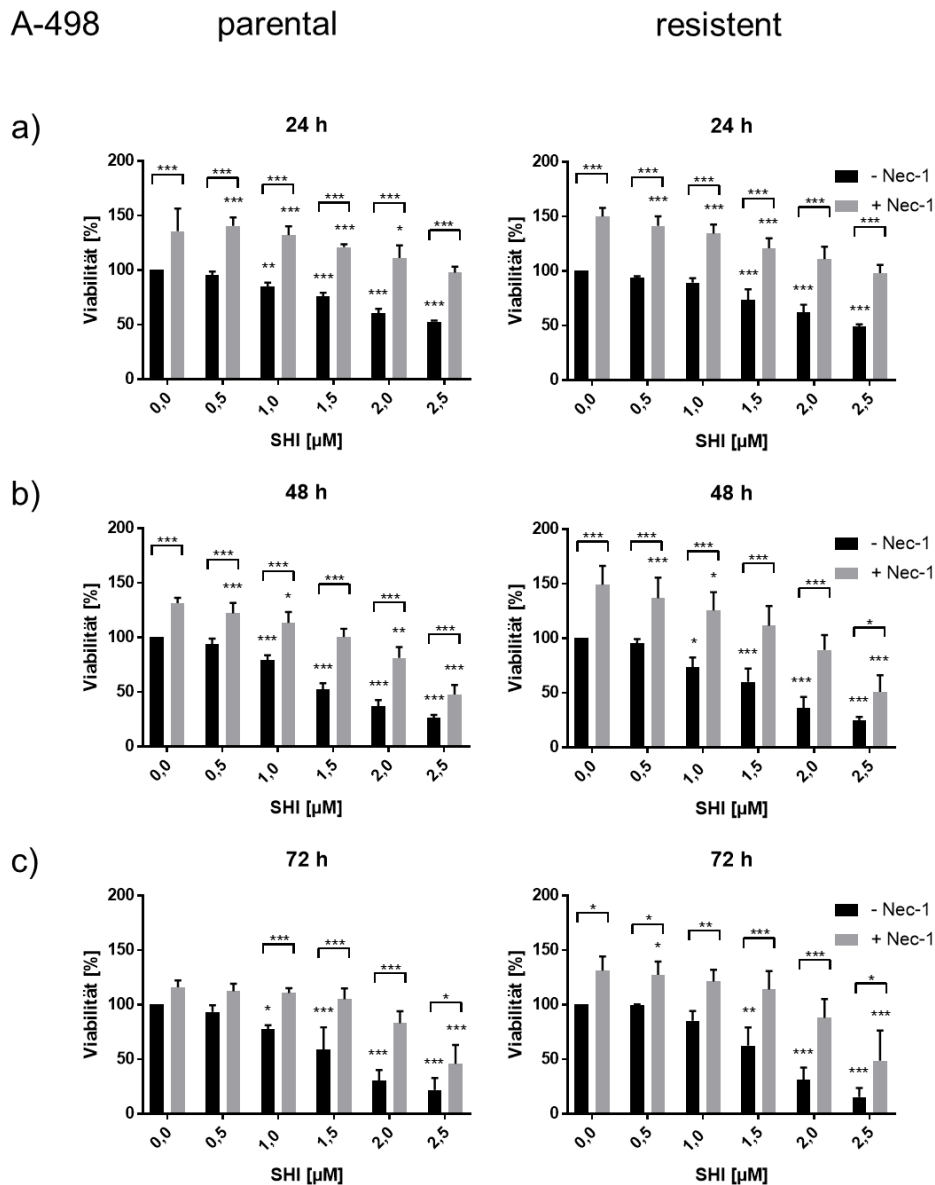


Abbildung 53: Nekroptose-Nachweis in A-498 Zellen nach SHI-Behandlung. Wachstum (MTT) parentaler (linksseitig) und Sunitinib-resistenter (rechtsseitig) A-498 Zellen für 24 h (a), 48 h (b) und 72 h (c) mit SHI [0,5 – 2,5 μM] allein oder in Kombination mit Necrostatin-1 (Nec-1) [80 μM], einem Nekroptose-Inhibitor, behandelt. Viabilität = Zellwachstum. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (= 100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit Ausnahme der Klammern mit Sternchen, die einen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten und mit Necrostatin-1 behandelten Zellen zeigen: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Vertiefend wird an der Zelllinie 786-O die Expression des Nekrosomkomplexproteins RIP1 nach 24 h Behandlung mit 1 μ M SHI untersucht. Tatsächlich kann nach SHI-Gabe eine signifikante Zunahme der RIP1-Expression in den Sunitinib-resistenten 786-O Zellen beobachtet werden (Abbildung 54 a). In den parental und Sunitinib-resistenten 786-O Zellen wird zudem RIP1 signifikant aktiviert (pRIP1) (Abbildung 54 b).

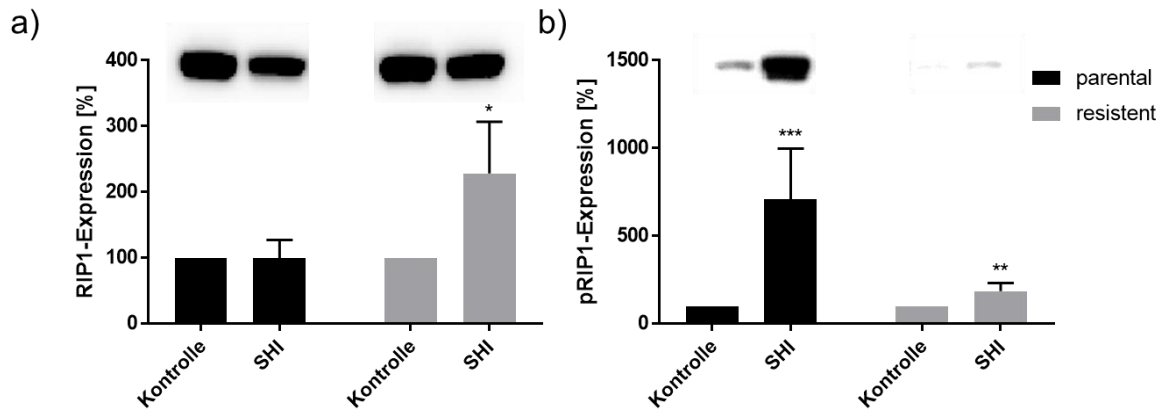


Abbildung 54: RIP1-Expression in 786-O Zellen nach SHI-Behandlung. Western-Blot-Analyse der 786-O Zellen nach 24 h Behandlung mit SHI [1 μ M]. Pixelanalyse und jeweils ein repräsentativer Western-Blot der RIP1- (a) und pRIP1-Expression (b) in %. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Die Behandlung mit SHI [1 μ M] über 24 h führt hingegen zu keinem signifikanten Anstieg der Caspase 3 und 8 in parental und Sunitinib-resistenten 786-O Zellen (Abbildung 55 a + b). Auch das an der DNA-Reparatur beteiligte Protein PARP liegt nach der SHI-Gabe unverändert vor (Abbildung 55 c). Vielmehr mündet die Inkubation mit SHI in einer signifikanten Inhibition der Caspase 3. In parental Zellen ist die Protease auf 68,92 % und in Sunitinib-resistenten 786-O Zellen auf 66,44 % im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen reduziert (Abbildung 55 a).

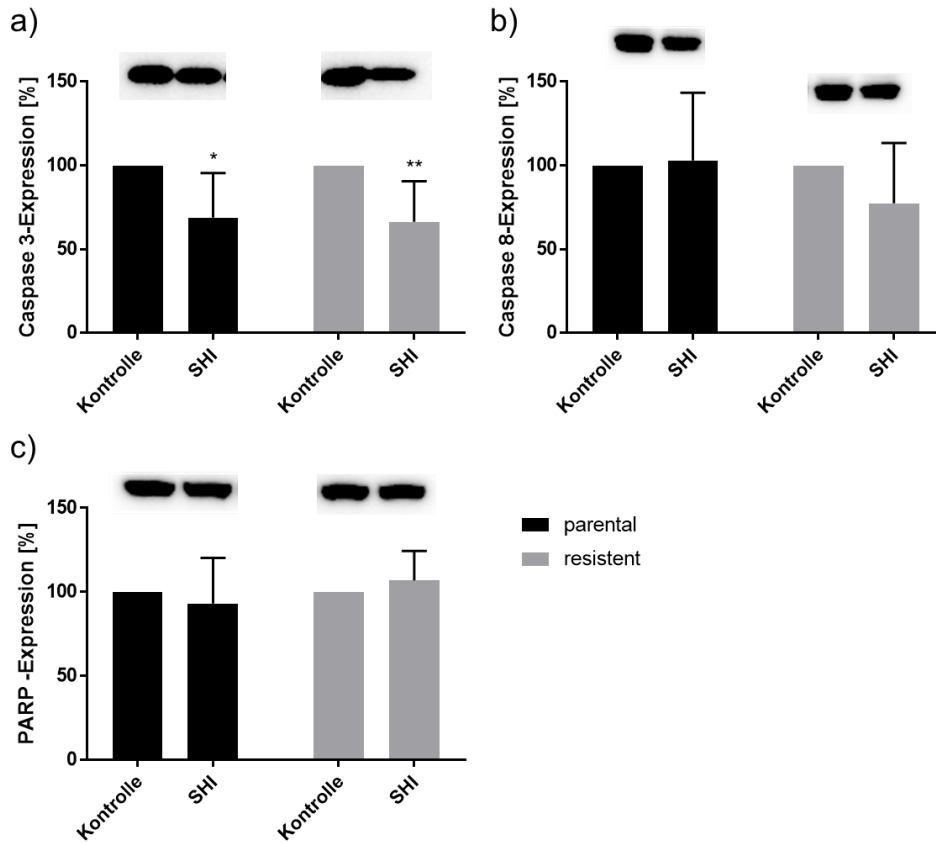


Abbildung 55: Expression relevanter Apoptoseproteine in 786-O Zellen nach SHI-Behandlung. Parentale und Sunitinib-resistente 786-O Zellen für 24 h mit SHI [1 μ M] behandelt. Repräsentativer Western-Blot und Pixelanalyse der Westen-Blots von Caspase 3 (a), Caspase 8 (b) und PARP (c). Expression in %. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 4.

3.5 Veränderungen des Metastasierungsverhaltens

Die Metastasierung mit Adhäsion, Migration und Invasion der NZK-Zellen ist maßgebend für die Mortalität des NZK. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob und inwiefern ART oder SHI die Metastasierungeigenschaften fortgeschrittener und therapieresistenter NZK-Zellen funktionell und molekular beeinflussen. Dabei lag der Fokus auf den Zelllinien Caki-1 und 786-O.

3.5.1 Adhäsion der NZK-Zellen an EZM-Proteine und HUVEC nach ART- oder SHI-Gabe

3.5.1.1 ART beeinflusst die Adhäsion von NZK-Zellen

Die Behandlung mit 20 μ M ART führt zu einer signifikanten Reduktion des Adhäsionspotenzials parentaler Caki-1 Zellen (Abbildung 56 (parental)). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100 %) ist nach ART-Behandlung die unspezifische Bindung an Plastik (PBS) auf 74,66 %, an Kollagen auf 67,50 %, an Fibronektin auf 60,07 % und an HUVEC auf 62,35 % signifikant reduziert (Abbildung 56 a + b (parental)). Die mit ART behandelten Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen zeigen hingegen keine veränderte Adhäsion (Abbildung 56 a + b (resistent)).

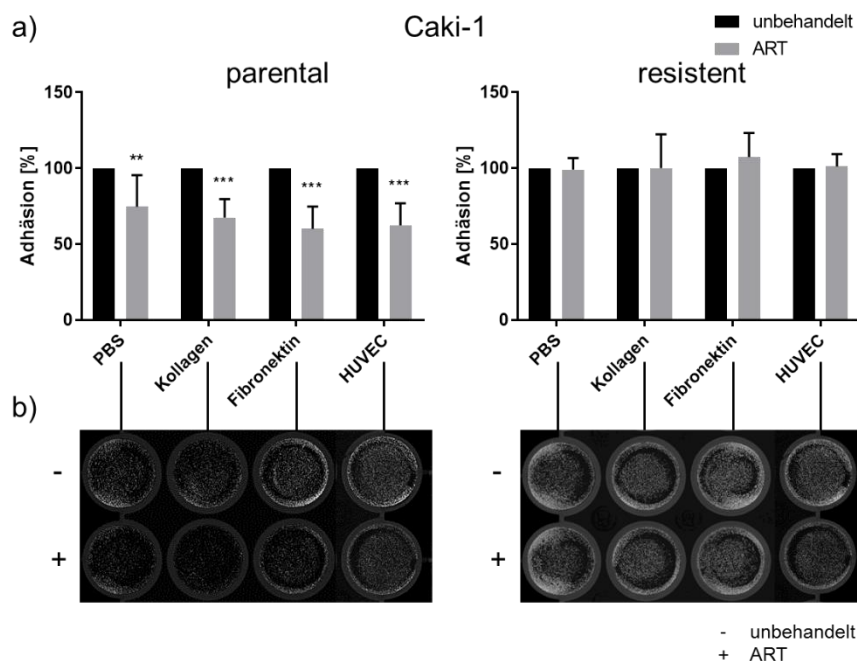


Abbildung 56: Adhäsion der ART-behandelten Caki-1 Zellen an extrazelluläre Matrixproteine und vaskuläres Endothel (HUVEC). Parentale und Sunitinib-resistente Caki-1 Zellen nach 72 h Behandlung mit ART [20 μ M]. Anheftung der Caki-1 Zellen in Prozent (a). Repräsentative Aufnahme der Adhäsionsplatten (b). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. n = 5.

Bei den 786-O Zellen verhält es sich genau umgekehrt wie bei den Caki-1 Zellen. Hier weisen Sunitinib-resistente 786-O Zellen unter ART-Einfluss eine signifikant reduzierte Adhäsion auf. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100 %) beträgt die unspezifische Bindung nach ART-Gabe 83,1 % (PBS), wohingegen nur noch 58,75 % der Zellen an Kollagen, 64,42 % an Fibronektin und 70,52 % an HUVEC adhären (Abbildung 57 a + b (resistent)). Parentale 786-O Zellen zeigen nach der ART-Gabe hingegen keine signifikante Veränderung der Adhäsion (Abbildung 57 a + b (parental)).

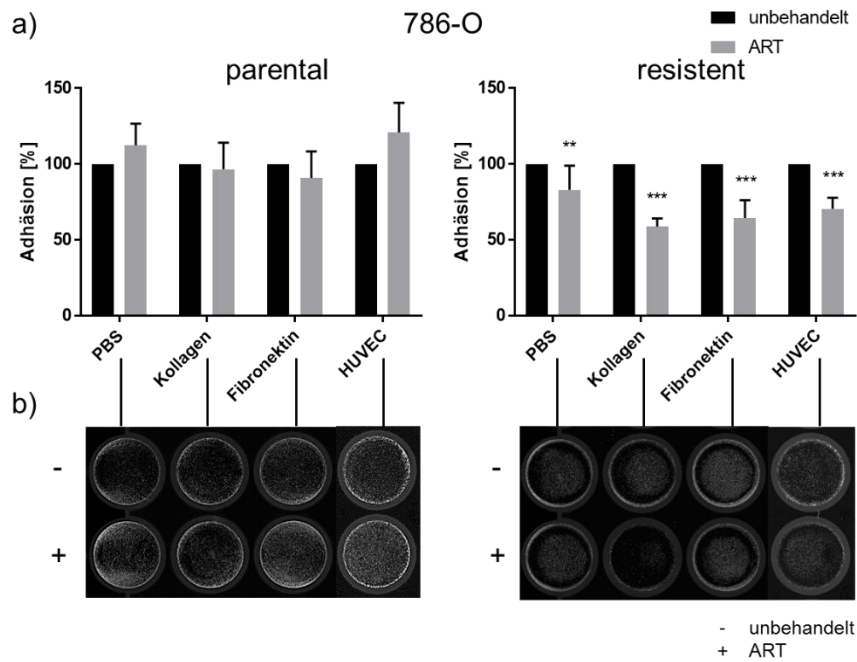


Abbildung 57: Adhäsion der ART-behandelten 786-O Zellen an extrazelluläre Matrixproteine und vaskuläres Endothel (HUVEC). Parentale und Sunitinib-resistente 786-O Zellen nach 72 h Behandlung mit ART [20 µM]. Anheftung der 786-O Zellen in Prozent (a). Repräsentative Aufnahme der Adhäsionsplatten (b). Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

3.5.1.2 SHI beeinflusst nicht die Adhäsion der NZK-Zellen

Die Behandlung mit 1 μM SHI (Abbildung 58 a + b) führt weder bei parentalen noch bei Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen zu einer veränderten Adhäsion an die EZM-Proteine Kollagen und Fibronektin. Auch die Anheftung an HUVEC bleibt im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (100 %) durch SHI unbeeinflusst (Abbildung 58 a + b).

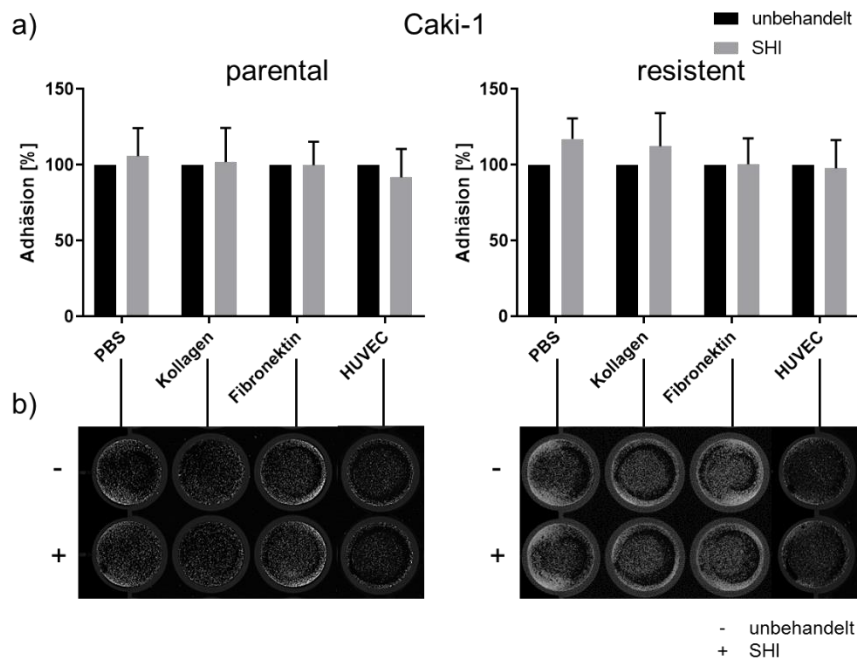


Abbildung 58: Adhäsion der SHI-behandelten Caki-1 Zellen an extrazelluläre Matrixproteine und vaskuläres Endothel (HUVEC). Parentale und Sunitinib-resistente Caki-1 Zellen nach 72 h Behandlung mit SHI [1 μM]. Anheftung der Caki-1 Zellen in Prozent (a). Repräsentative Aufnahme der Adhäsionsplatten (b). Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Bei den 786-O Zellen konnte SHI nur partiell Effekte in den parentalen Zellen induzieren. So resultierte die Inkubation mit SHI in den parentalen 786-O Zellen in einer signifikant gesteigerten Adhäsion (126,62 %) (unspezifische Bindung; PBS) (Abbildung 59 a + b (parental)). Außerdem ist die Anheftung von parentalen 786-O Zellen an HUVEC um 54,45 % (154,45 %) signifikant erhöht. Sunitinib-resistente Zellen werden in ihrer Adhäsion nicht von der SHI-Behandlung beeinflusst (Abbildung 59 a + b (resistent)).

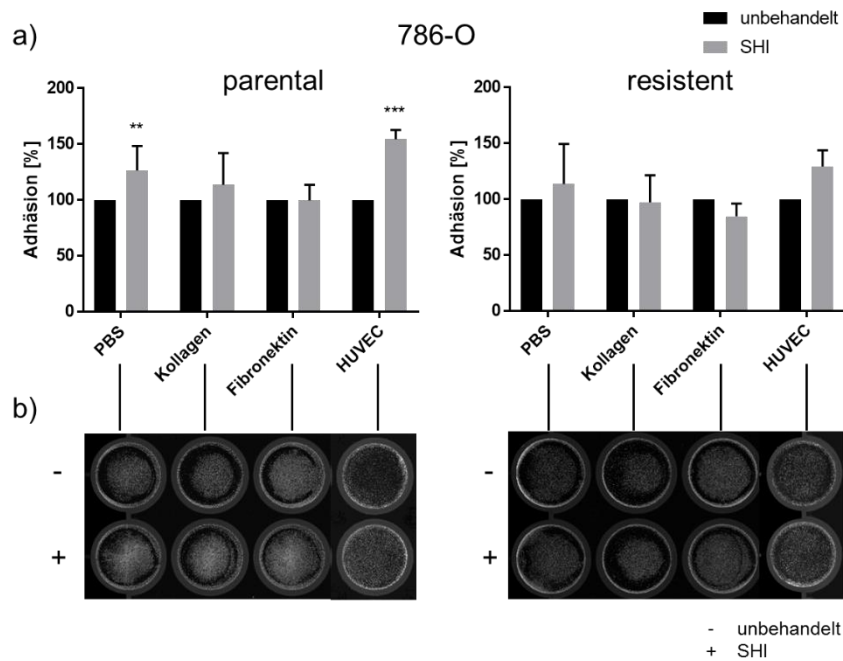


Abbildung 59: Adhäsion der SHI-behandelten 786-O Zellen an extrazelluläre Matrixproteine und vaskuläres Endothel (HUVEC). Parentale und Sunitinib-resistente 786-O Zellen nach 72 h Behandlung mit SHI [1 μ M]. Anheftung der 786-O Zellen in Prozent (a). Repräsentative Aufnahme der Adhäsionsplatten (b). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

3.5.2 Der Einfluss von ART und SHI auf die Migration und Chemotaxis der NZK-Zellen

3.5.2.1 Basale Migration und Chemotaxis von Caki-1 und 786-O Zellen

Sunitinib-resistente Caki-1 Zellen zeigen eine signifikante, ca. 6-fach gesteigerte Migration (605,79 %) und ca. 5-fach erhöhte chemotaktische Aktivität (527,1 %) im Vergleich zu den parentalen Schwesterzellen (Abbildung 60 a). Unterschiede zwischen parentalen und Sunitinib-resistenten Zellen sind bei der Zelllinie 786-O nur in der Migration zu erkennen, die bei den Sunitinib-resistenten 786-O Zellen schwach, jedoch signifikant reduziert ist (73,45 %) (Abbildung 60 b).

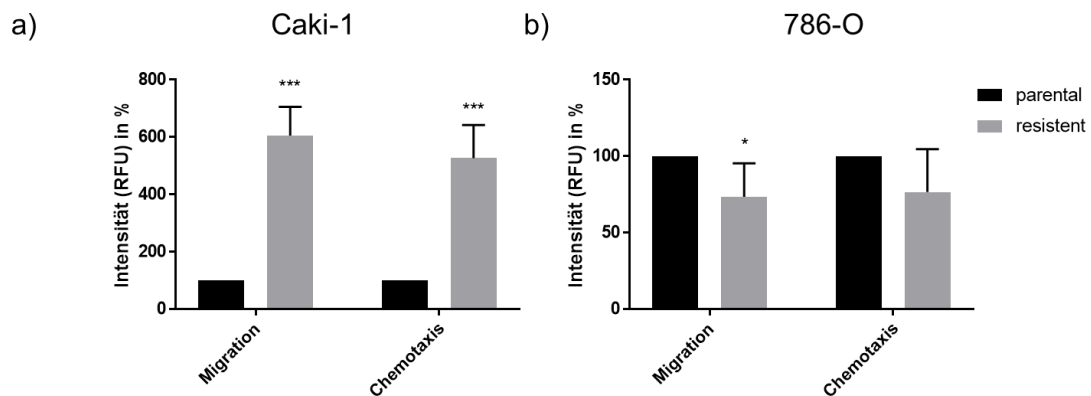


Abbildung 60: Basale Migration und Chemotaxis der NZK-Zellen. Parentale und Sunitinib-resistente Caki-1 (a) und 786-O (b) Zellen nach 24 h Inkubation in dem Doppelkammersystem. Parentale Zellen wurden auf 100 % gesetzt und den Sunitinib-resistenten Zellen (resistent) gegenübergestellt. Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung ($\pm SD$). Signifikanz im Vergleich parentale versus resistente Zellen: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

3.5.2.2 ART beeinflusst die Migration und Chemotaxis von NZK-Zellen

Bei Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen ist nach Exposition mit 20 μM ART eine signifikant verminderte Migration und Chemotaxis zu verzeichnen (Abbildung 61 a + b (resistent)). So sinkt die Anzahl migrierender Zellen, die im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100 %) einem chemotaktischen Reiz folgen, signifikant auf 58,45 % und auf 60,25 % ab. Die Behandlung von parentalen Caki-1 Zellen mit 20 μM ART konnte keine Veränderung der Migration und Chemotaxis induzieren (Abbildung 61 a + b (parental)).

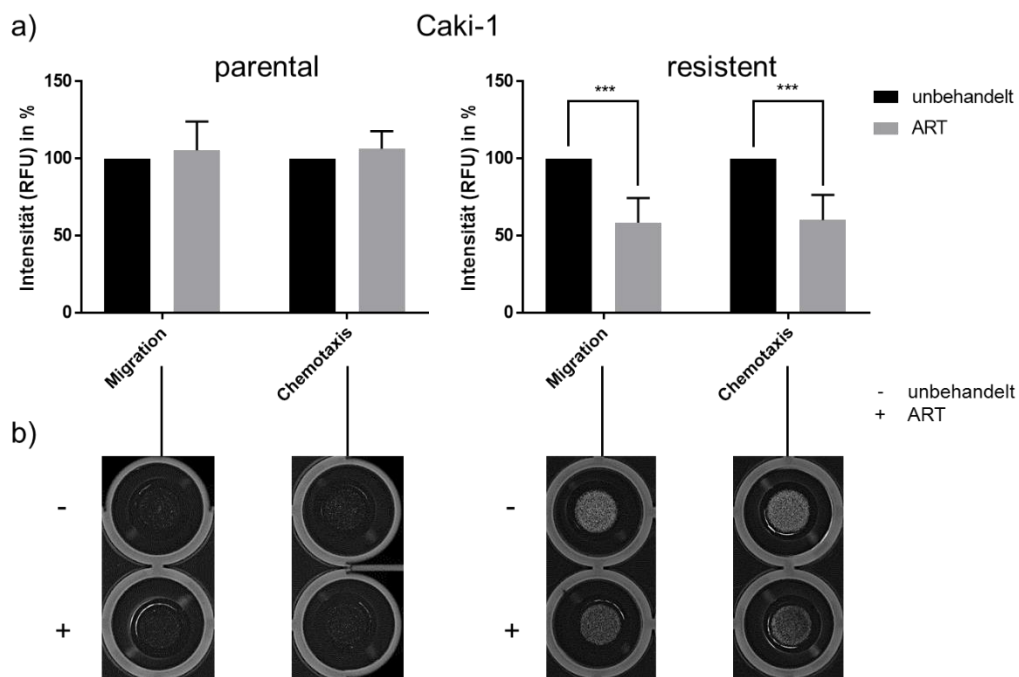


Abbildung 61: Migration und Chemotaxis der Caki-1 Zellen nach Behandlung mit ART. Parentale und Sunitinib-resistente Caki-1 Zellen über 72 h mit ART [20 μM] behandelt. Balkendiagramm (a). Darstellung eines repräsentativen Versuchs (b). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Auch in parentalen 786-O Zellen führt die Inkubation mit 20 μM ART zu einer signifikant reduzierten Migration (78,04 %) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 62 a + b (parental)). Eine signifikante Veränderung der Chemotaxis ist hingegen nicht zu erkennen. Bei Sunitinib-resistenten 786-O Zellen zeigt die Behandlung mit ART nur eine tendenzielle, aber keine signifikante Verminderung der Migration (Abbildung 62 a + b (resistent)).

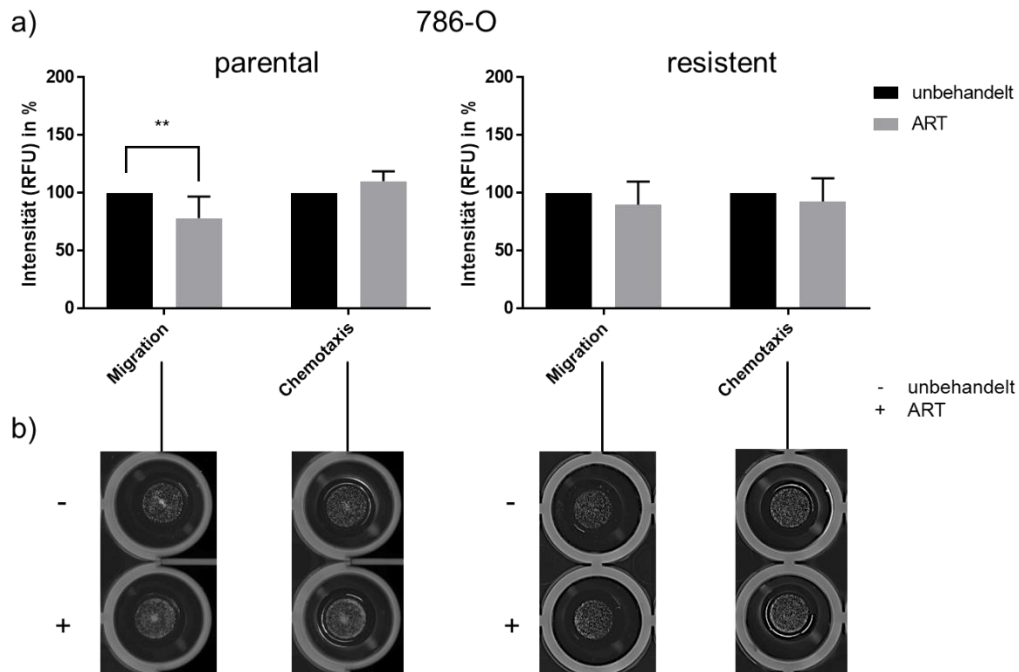


Abbildung 62: Migration und Chemotaxis der 786-O Zellen nach Behandlung mit ART. Parentale und Sunitinib-resistente 786-O Zellen über 72 h mit ART [20 μM] behandelt. Balkendiagramm (a). Darstellung eines repräsentativen Versuchs (b). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

3.5.2.3 ART reduziert die Migration von NZK-Zellen im Wundheilungstest

Die Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen migrieren deutlich schneller als die parentalen Zellen (Abbildung 63 c). So migrieren innerhalb von 24 h die parentalen Zellen zu ca. 50 % in die freie Fläche (entspricht 2×10^6 Pixel), während die Sunitinib-resistenten Zellen vollständig in die freie Fläche migrieren. Die Behandlung der Sunitinib-resistenten Caki-1 mit $40 \mu\text{M}$ ART reduziert die Migration signifikant und die Behandlung mit $50 \mu\text{M}$ ART verstärkt den Effekt weiter (Abbildung 63 b). Die Behandlung von parentalen Caki-1 Zellen mit ART zeigt hingegen keine Veränderungen der Migration (Abbildung 63 a).

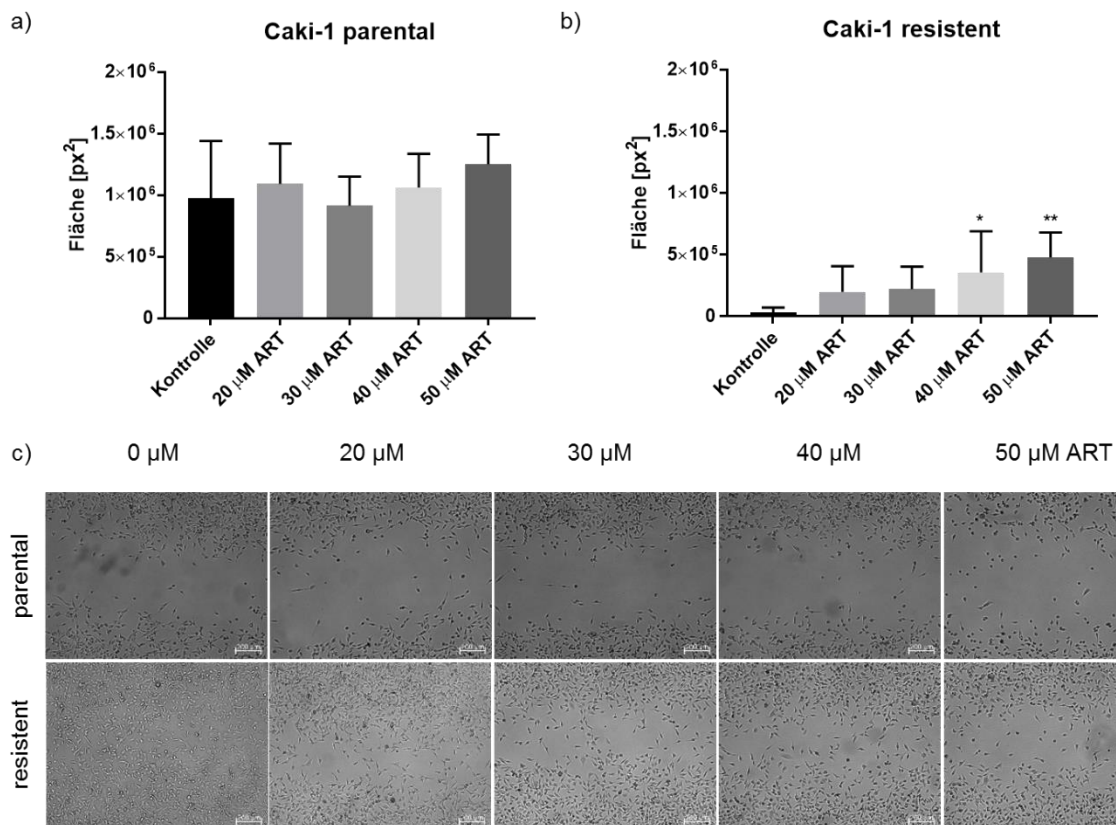


Abbildung 63: Migration der Caki-1 Zellen im Wundheilungstest nach ART-Behandlung. Wundheilungstest von parentalen (a) und Sunitinib-resistenten (b) Caki-1 Zellen über 24 h mit ART [20 – 50 μM] behandelt. Balkendiagramm. Darstellung eines repräsentativen Versuchs in 50 x Vergrößerung (c). Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Wachstumsfläche bei 0 h = 2×10^6 Pixel. Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Ergebnisse

Parentale 786-O Zellen zeigen eine Migration, die der der Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen entspricht. Auch hier migrieren die Zellen innerhalb von 24 h vollständig in die zu Verfügung stehende Fläche ein (Abbildung 64 c). Sunitinib-resistente 786-O Zellen migrieren unbehandelt nach 24 h hingegen zu ca. 75 % in die freie Fläche (Abbildung 64 b + c). Bereits 20 μM ART kann die Migration der Sunitinib-resistenten 786-O Zellen signifikant reduzieren. Der inhibierende Effekt wird bis zu einer Konzentration von 50 μM ART sogar noch weiter gesteigert (Abbildung 64 b). Auch parentale 786-O Zellen werden von ART signifikant in der Migration gehemmt, hier aber erst ab 50 μM ART (Abbildung 64 a + c).

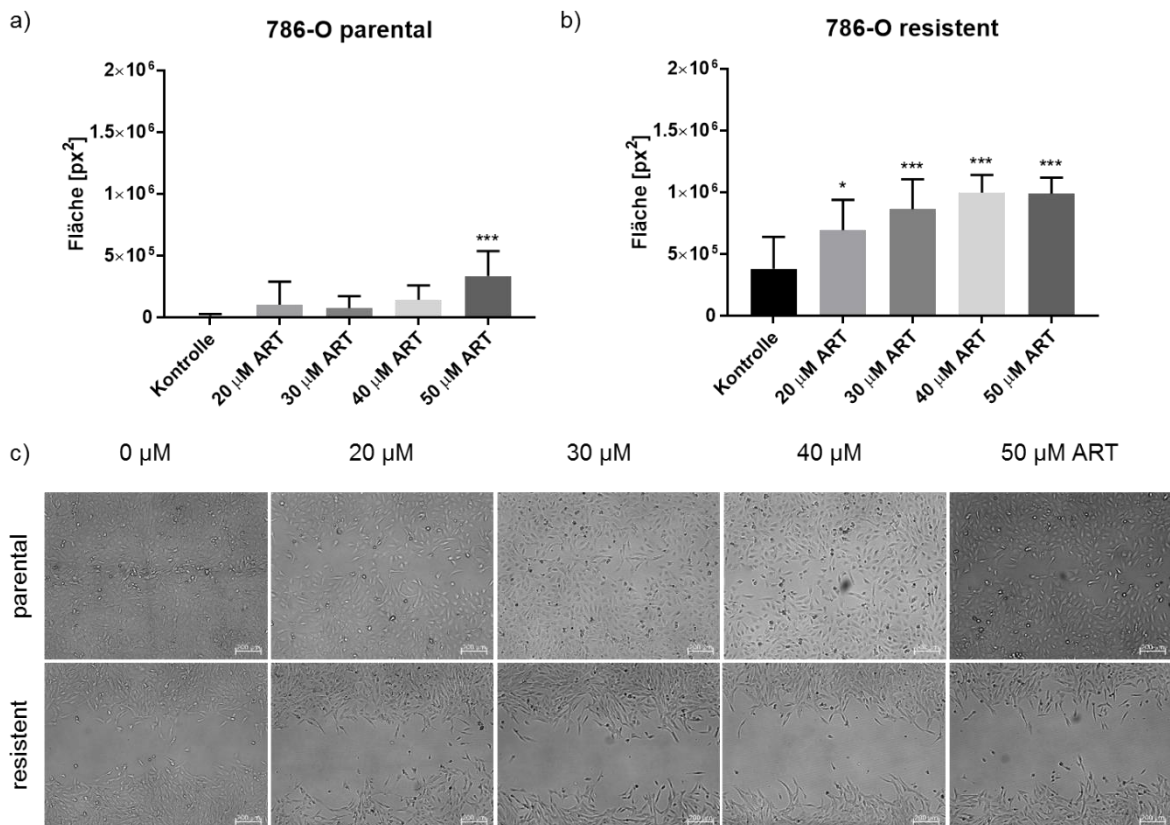


Abbildung 64: Migration der 786-O Zellen im Wundheilungstest nach ART-Behandlung. Wundheilungstest von parentalen (a) und Sunitinib-resistenten (b) 786-O Zellen über 24 h mit ART [20 – 50 μM] behandelt. Balkendiagramm. Darstellung eines repräsentativen Versuchs in 50 x Vergrößerung (c). Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Wachstumsfläche bei 0 h = 2×10^6 Pixel. Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

3.5.2.4 SHI beeinflusst zelltypspezifisch die Migration und Chemotaxis

Die Inkubation mit SHI [1 μ M] hat keinen signifikanten Einfluss auf die Migration und Chemotaxis der Caki-1 Zellen (Abbildung 65 a).

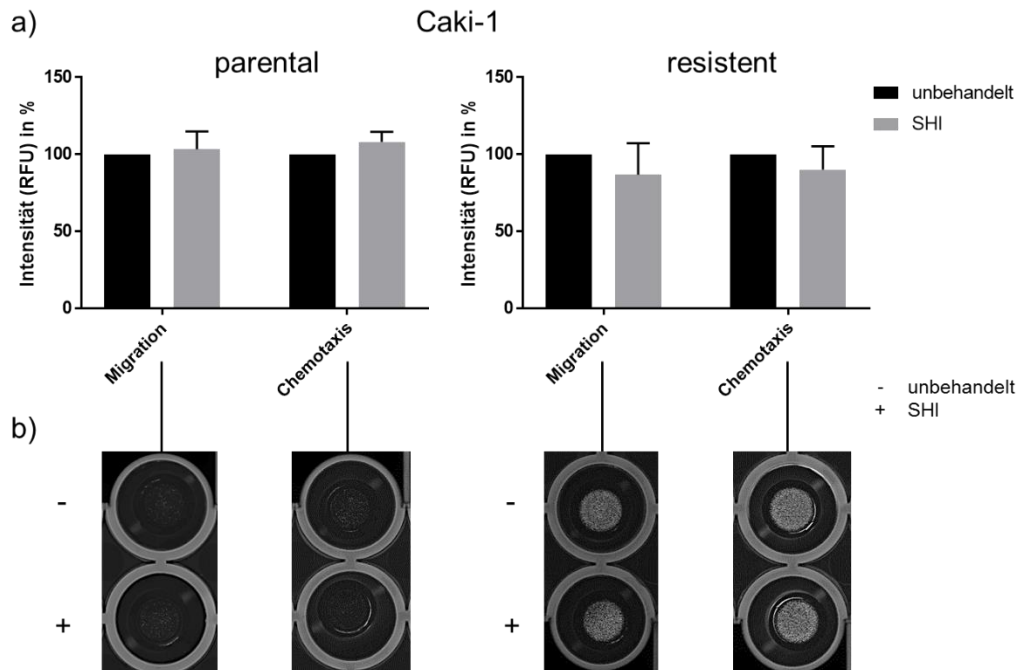


Abbildung 65: Migration und Chemotaxis von Caki-1 Zellen nach Behandlung mit SHI. Parentale und Sunitinib-resistente Caki-1 Zellen über 72 h mit SHI [1 μ M] behandelt. Balkendiagramm (a). Darstellung eines repräsentativen Versuchs (b). Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Ergebnisse

786-O Zellen zeigen nach SHI-Gabe [1 μ M] hingegen eine erhöhte Migration (parental: 164,55 %; resistant: 124,43 %) und chemotaktische Aktivität (parental: 169,26 %; resistant: 144,32 %) (Abbildung 66).

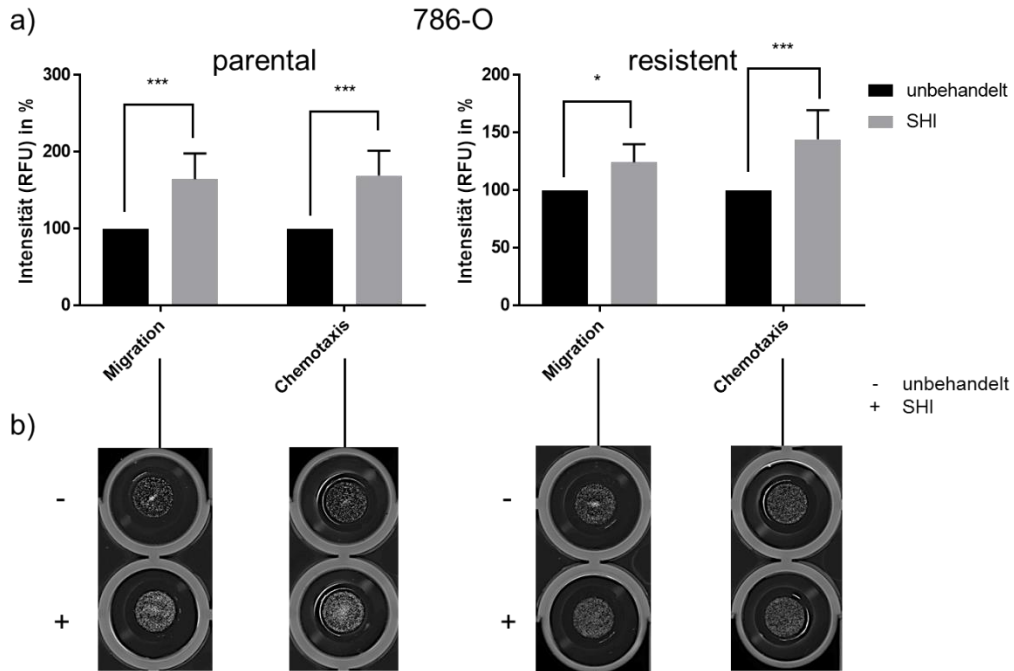


Abbildung 66: Migration und Chemotaxis von 786-O Zellen nach Behandlung mit SHI. Parentale und Sunitinib-resistente 786-O Zellen über 72 h mit SHI [1 μ M] behandelt. Balkendiagramm (a). Darstellung eines repräsentativen Versuchs (b). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

3.5.3 Modulation der Integrin-Expressionsprofile unter ART oder SHI

Integrine sind unter anderem relevante Adhäsionsrezeptoren und können so maßgeblich an der Metastasierung beteiligt sein.

Die Caki-1 Zelllinie weist eine starke basale Expression der Integrine $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\beta 1$ auf (Abbildung 67 a + b). Die Integrine $\alpha 1$, αv , $\beta 4$ und $\beta 5$ werden hingegen nicht oder nur moderat exprimiert. Die restlichen Integrine $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 6$ und $\beta 3$ zeigen eine mittlere Expression. Signifikante Unterschiede in den Integrin-Expressionsprofilen zwischen parentalen und Sunitinib-resistenten Zellen sind nur beim Integrin $\alpha 5$ zu detektieren, das in Sunitinib-resistenten Zellen höher exprimiert vorliegt (Abbildung 67 c).

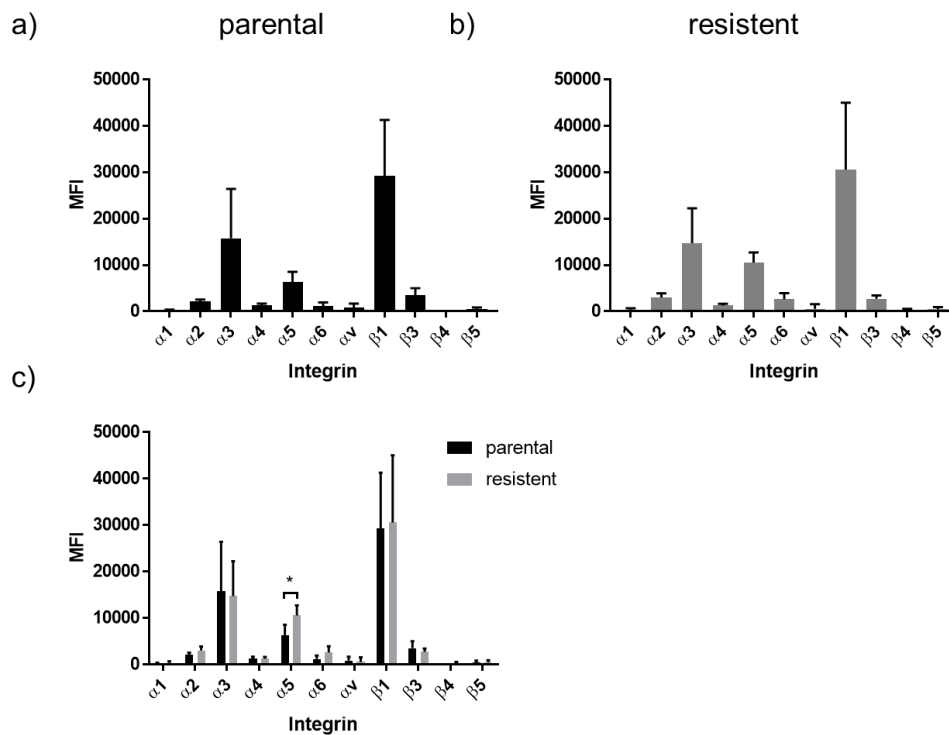


Abbildung 67: Basales Integrin-Expressionsprofil der Zelllinie Caki-1. Parentale (a) und Sunitinib-resistente (b) Caki-1 Zellen. Unterschiede in der basalen Integrin-Expression parentaler und Sunitinib-resistenter Zellen (c). MFI = Mean Fluorescence Intensity. Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Klammern = signifikante Unterschiede zwischen parentalen und Sunitinib-resistenten Zellen. Signifikanz: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Ergebnisse

Die Zelllinie 786-O weist eine starke basale Expression der Integrine $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\beta 3$ auf (Abbildung 68 a + b). Die Integrine $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\beta 4$ und $\beta 5$ werden hingegen nicht oder nur moderat exprimiert. Die restlichen Integrine, $\alpha 2$, $\alpha 6$ und αv , zeigen eine mittlere Expression. Signifikante Unterschiede in der Expression zwischen parentalen und Sunitinib-resistenten Zellen sind nicht zu detektieren (Abbildung 68 c).

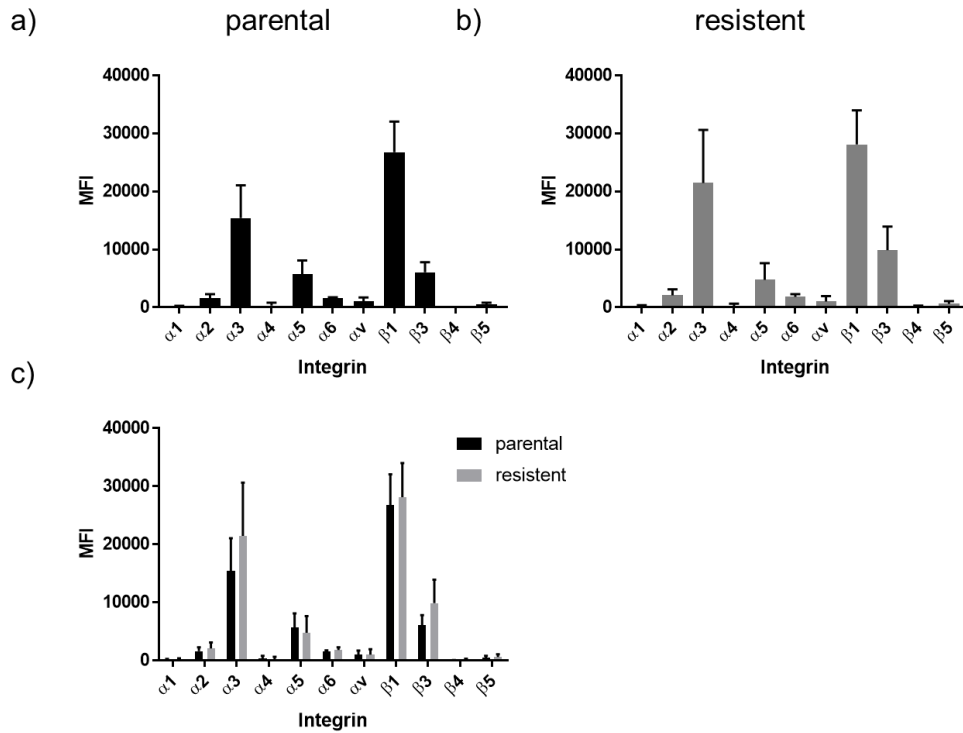


Abbildung 68: Basales Integrin-Expressionsprofil der Zelllinie 786-O. Parentale (a) und Sunitinib-resistente (b) 786-O Zellen. Unterschiede in der basalen Integrin-Expression parentaler und Sunitinib-resistenter Zellen (c). MFI = Mean Fluorescence Intensity. Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Klammern = signifikante Unterschiede zwischen parentalen und Sunitinib-resistenten Zellen. Signifikanz: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Ergebnisse

Das basale Expressionsprofil der Zelllinie KTCTL-26 weist eine starke Expression der Integrine $\alpha 3$, $\beta 1$ und $\beta 3$ auf (Abbildung 69 a + b). Die Integrine $\alpha 4$, $\alpha 6$, αv , $\beta 4$ und $\beta 5$ werden hingegen nicht oder nur moderat exprimiert. Die restlichen Integrine, $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 5$, zeigen eine mittlere Expression. Eine signifikant geringere Expression der Integrine $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\beta 3$ ist bei Sunitinib-resistenten Zellen im Vergleich zu den parentalen KTCTL-26 Zellen nachweisbar (Abbildung 69 c).

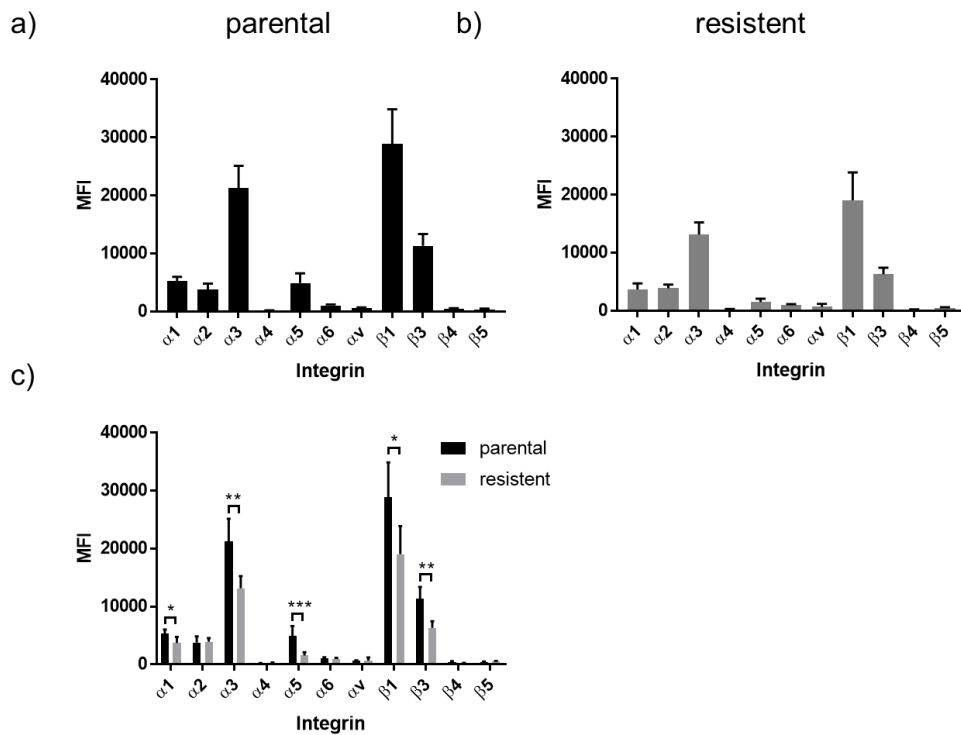


Abbildung 69: Basales Integrin-Expressionsprofil der Zelllinie KTCTL-26. Parentale (a) und Sunitinib-resistente (b) KTCTL-26 Zellen. Unterschiede in der basalen Integrin-Expression parentaler und Sunitinib-resistenter Zellen (c). MFI = Mean Fluorescence Intensity. Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Klammern = signifikante Unterschiede zwischen parentalen und Sunitinib-resistenten Zellen. Signifikanz: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Das basale Expressionsprofil der Zelllinie A-498 weist eine hohe Expression der Integrine $\alpha 3$, $\beta 1$ und $\beta 3$ auf (Abbildung 70 a + b). Die Integrine $\alpha 6$, αv , $\beta 4$ und $\beta 5$ werden hingegen nicht oder nur moderat exprimiert. Die Integrine $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$ und $\alpha 5$ zeigen eine mittlere Expression. Signifikante Unterschiede zwischen parentalen und Sunitinib-resistenten Zellen sind nicht zu detektieren (Abbildung 70 c).

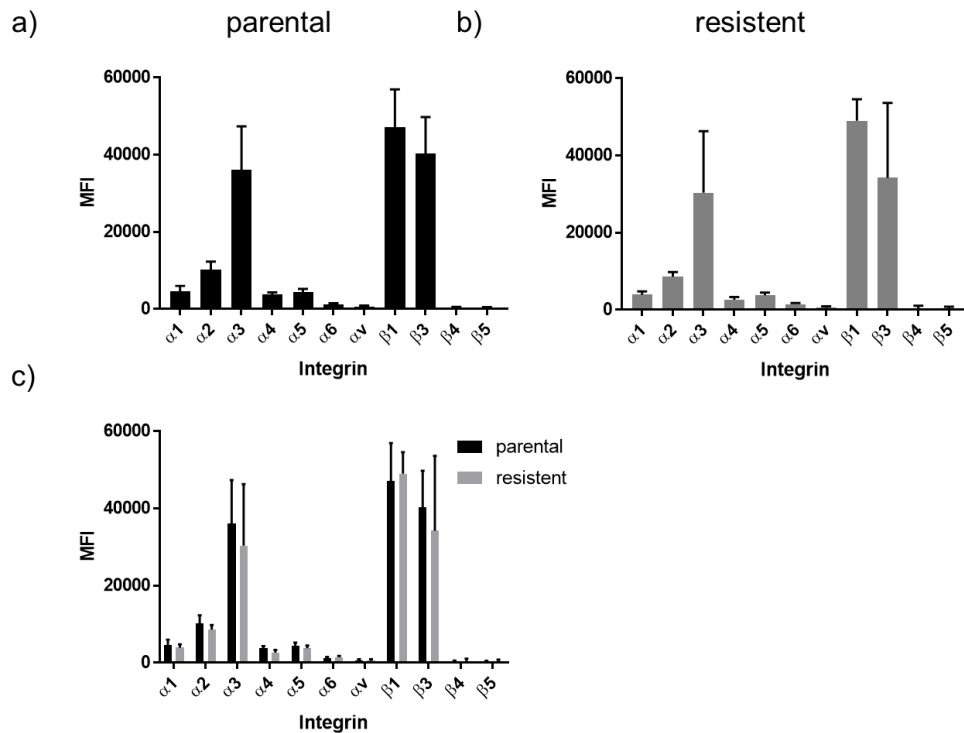


Abbildung 70: Basales Integrin-Expressionsprofil der Zelllinie A-498. Parentale (a) und Sunitinib-resistente (b) A-498 Zellen. Unterschiede in der basalen Integrin-Expression parentaler und Sunitinib-resistenter Zellen (c). MFI = Mean Fluorescence Intensity. Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung ($\pm SD$). Klammern = signifikante Unterschiede zwischen parentalen und Sunitinib-resistenten Zellen. Signifikanz: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

3.5.3.1 ART verändert das Integrin-Expressionsprofil von NZK-Zellen

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100 %) sind die Integrine $\alpha 5$ (62,43%) und $\beta 1$ (76,62 %) nach der ART-Behandlung in den parentalen Caki-1 Zellen signifikant reduziert (Abbildung 71 a). Für Integrin $\beta 3$ (170,78 %) ist hingegen ein signifikanter Anstieg der Expression nach ART-Gabe zu erkennen. Die Behandlung Sunitinib-resistenter Caki-1 Zellen mit ART mündet in einer signifikant gesteigerten Expression von Integrin $\alpha 3$ (205,01 %) und $\beta 1$ (126,29 %). Integrin $\alpha 5$ (88,47 %) ist hingegen, wie in den parentalen Zellen, signifikant reduziert (Abbildung 71 b).

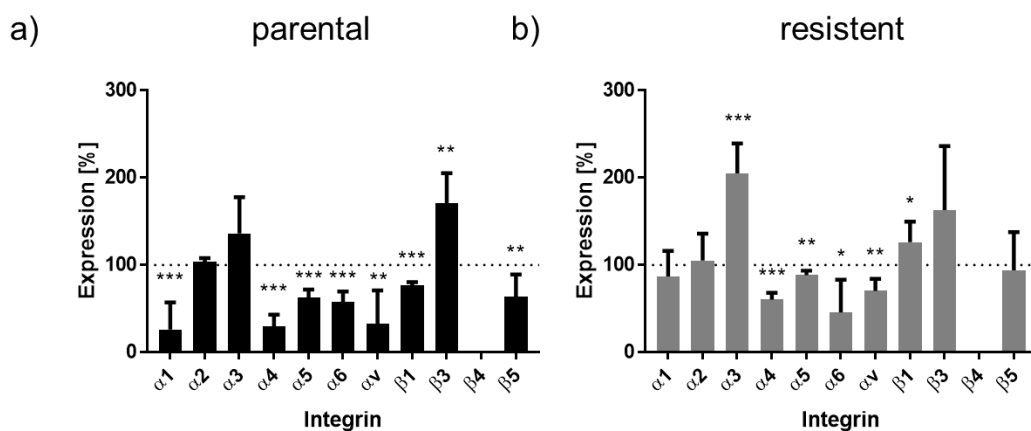


Abbildung 71: Integrin-Expressionsmuster der Zelllinie Caki-1 nach ART-Behandlung. Parentale (a) und Sunitinib-resistente (b) Caki-1 Zellen nach einer Behandlung mit ART [20 μ M] über 72 h. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Nach der Behandlung parentaler und Sunitinib-resistenter 786-O Zellen mit ART ist im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100 %) das Integrin $\alpha 3$ (parental: 126,23 %; resistent: 129 %) signifikant gesteigert und das Integrin $\beta 3$ (parental: 60,73 %; resistent: 80,63 %) signifikant reduziert (Abbildung 72 a + b). Zudem mündet die ART-Gabe von Sunitinib-resistenten 786-O Zellen in einem signifikanten Anstieg der Integrine $\alpha 5$ (124 %) und $\beta 1$ (143,76 %) (Abbildung 72 b).

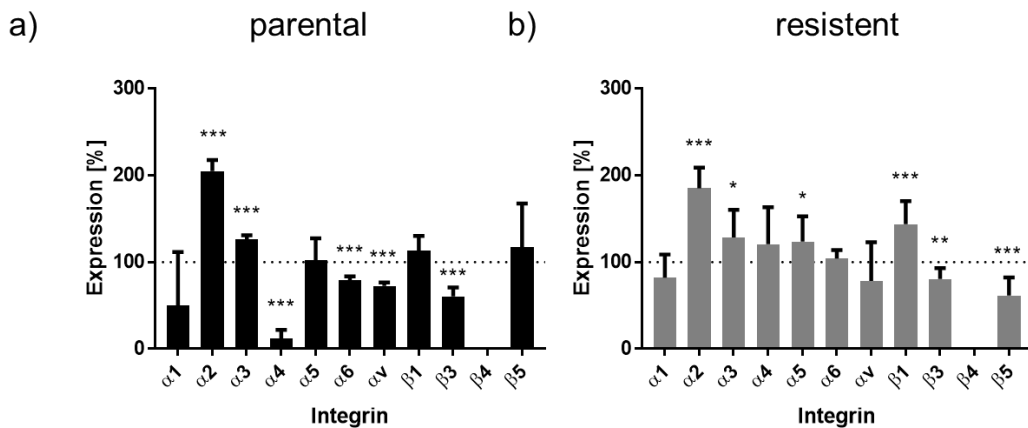


Abbildung 72: Integrin-Expressionsmuster der Zelllinie 786-O nach ART-Behandlung. Parentale (a) und Sunitinib-resistente (b) 786-O Zellen nach einer Behandlung mit ART [20 μ M] über 72 h. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100 %) führt die Behandlung mit ART bei parentalen und Sunitinib-resistenten KTCTL-26 Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Integrine $\alpha 1$ (parental: 54,56 %; resistent: 78,34 %) und $\beta 3$ (parental: 89,27 %; resistent: 89,96 %). Weiterhin induziert ART einen signifikanten Anstieg der Integrine $\alpha 2$ (parental: 226,21 %; resistent: 236,04 %), $\alpha 3$ (parental: 119,14 %; resistent: 141,88 %) und $\alpha 5$ (parental: 133,13 %; resistent: 125,69 %) (Abbildung 73 a + b). In Sunitinib-resistenten Zellen ist zudem Integrin $\beta 1$ (143,33 %) durch ART gesteigert (Abbildung 73 b).

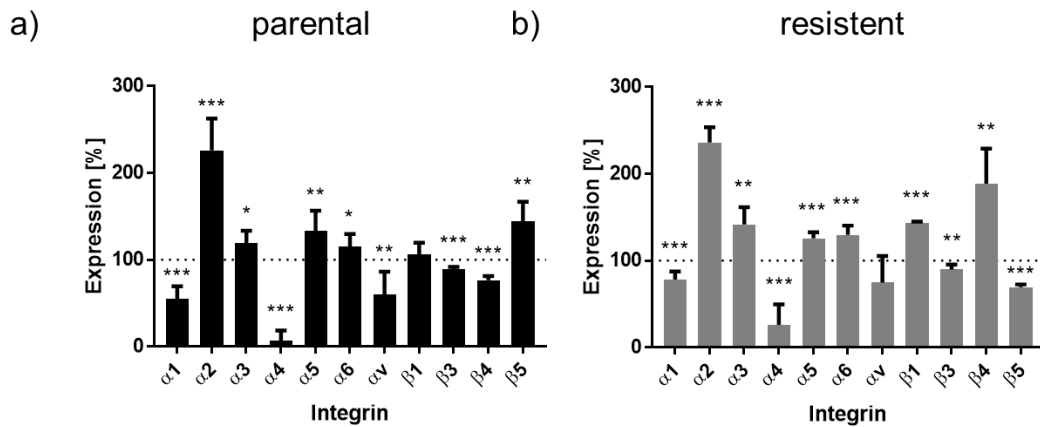


Abbildung 73: Integrin-Expressionsmuster der Zelllinie KTCTL-26 nach ART-Behandlung. Parentale (a) und Sunitinib-resistente (b) KTCTL-26 Zellen nach einer Behandlung mit ART [20 μ M] über 72 h. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

In parentalen und Sunitinib-resistenten A-498 Zellen induziert ART einen signifikanten Anstieg des Integrins $\alpha 2$ (parental: 217,05 %; resistent: 159,26 %) und $\alpha 5$ (parental: 148,90 %; resistent: 110,34 %) (Abbildung 74 a + b). Bei Sunitinib-resistenten Zellen liegen ferner die Integrine $\alpha 3$ (76,44 %), $\beta 1$ (63,99 %) und $\beta 3$ (66,09 %) reduziert vor (Abbildung 74 b).

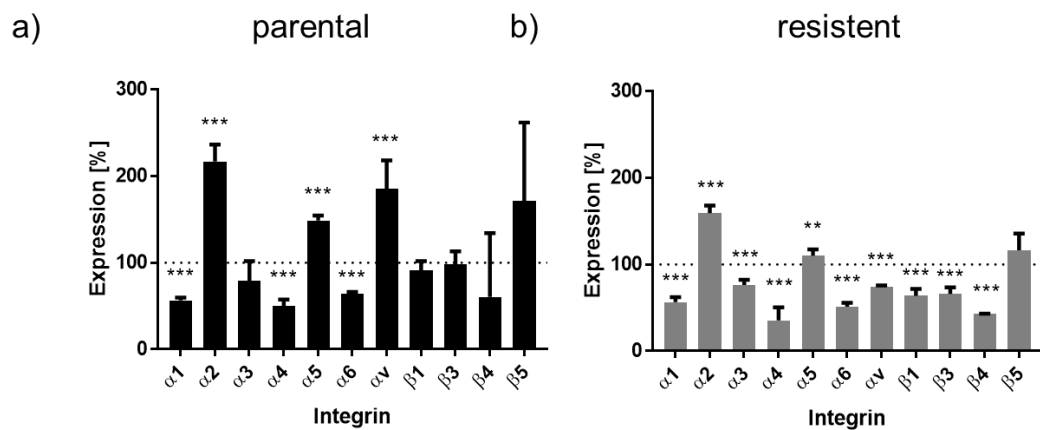


Abbildung 74: Integrin-Expressionsmuster der Zelllinie A-498 nach ART-Behandlung. Parentale (a) und Sunitinib-resistente (b) A-498 Zellen nach einer Behandlung mit ART [20 μ M] über 72 h. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

3.5.3.2 SHI verändert das Integrin-Expressionsprofil von NZK-Zellen

Die Behandlung mit SHI führt zu einer veränderten Oberflächenexpression der Integrine von Caki-1 Zellen (Abbildung 75 a + b). Bei parentalen und Sunitinib resistenten Caki-1 Zellen wird durch SHI Integrin $\alpha 3$ (parental: 69,88 %; resistent: 63,86 %) und $\alpha 5$ (parental: 76,22 %; resistent: 63,11 %) signifikant reduziert. Das Integrin $\beta 3$ liegt in den parentalen (200,9 %) und Sunitinib-resistenten (127,73 %) Caki-1 Zellen nach der SHI-Gabe hingegen signifikant gesteigert vor (Abbildung 75 a + b).

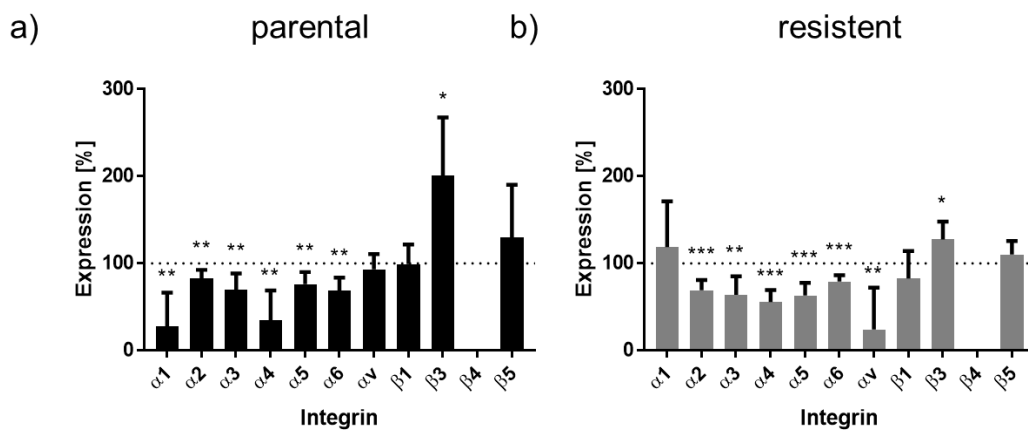


Abbildung 75: Integrin-Expressionsmuster der Zelllinie Caki-1 nach SHI-Behandlung. Parentale (a) und Sunitinib-resistente (b) Caki-1 Zellen nach einer Behandlung mit SHI [1 μ M] über 72 h. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Signifikante Veränderungen nach einer SHI-Behandlung sind bei parentalen 786-O Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100 %) messbar (Abbildung 76 a). So steigt Integrin $\alpha 5$ (118,48 %) und $\beta 3$ (132,42 %) nach SHI-Gabe signifikant an, wohingegen Integrin $\alpha 3$ (82,54 %) signifikant reduziert ist (Abbildung 76 a). Die Behandlung von Sunitinib-resistenten 786-O Zellen zeigt weiterhin einen signifikanten Anstieg von Integrin $\alpha 3$ (116,86 %), $\alpha 5$ (137,43 %) und $\beta 1$ (147,47 %) (Abbildung 76 b).

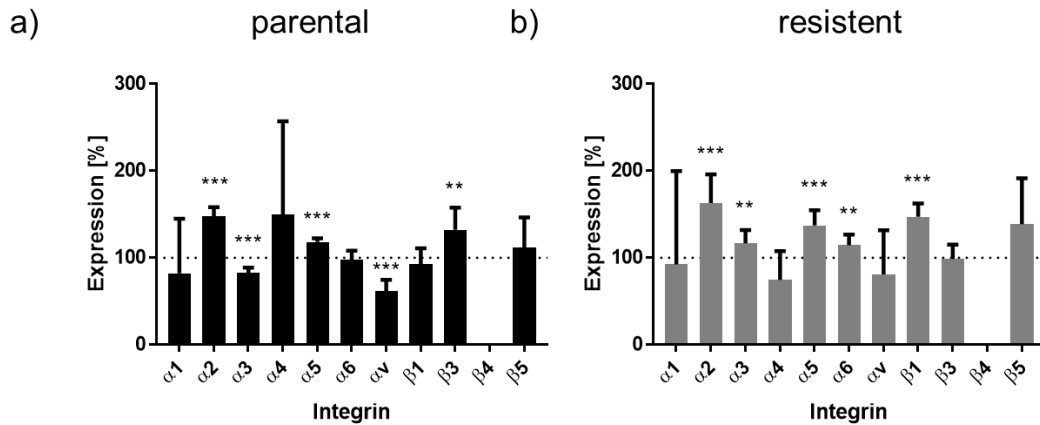


Abbildung 76: Integrin-Expressionsmuster der Zelllinie 786-O nach SHI-Behandlung. Parentale (a) und Sunitinib-resistente (b) 786-O Zellen nach einer Behandlung mit SHI [1 μ M] über 72 h. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

In parentalen KTCTL-26 Zellen induziert SHI eine signifikante Reduktion von Integrin $\alpha 3$ (79,51 %) und $\beta 1$ (92,28 %) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100 %) (Abbildung 77 a). Bei Sunitinib-resistenten Zellen führt die Exposition mit SHI zu einer signifikant verminderten Expression von Integrin $\alpha 3$ (77,09 %) sowie zu einem signifikanten Anstieg von Integrin $\alpha 2$ (120,64 %) und $\alpha 5$ (141,23 %) (Abbildung 77 b).

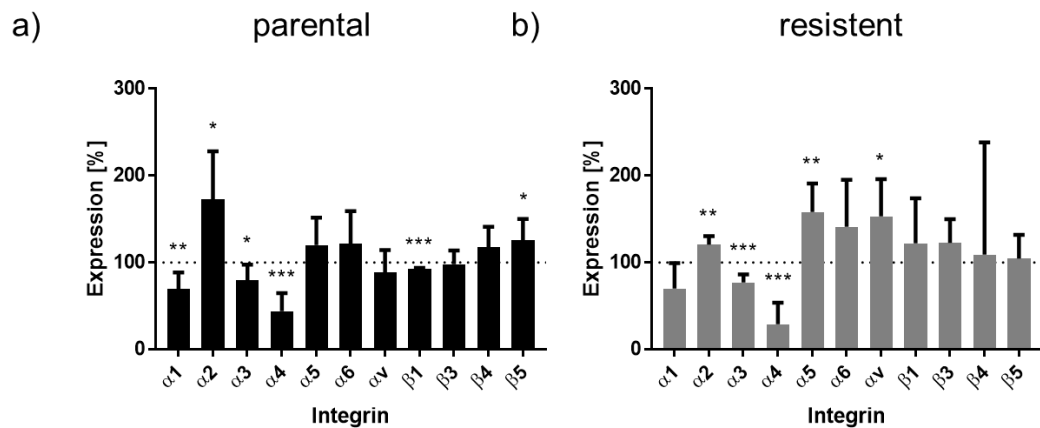


Abbildung 77: Integrin-Expressionsmuster der Zelllinie KTCTL-26 nach SHI-Behandlung. Parentale (a) und Sunitinib-resistente (b) KTCTL-26 Zellen nach einer Behandlung mit SHI [1 μ M] über 72 h. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

Die SHI-Gabe führt bei parentalen und Sunitinib-resistenten A-498 Zellen zu einer signifikanten Reduktion von Integrin $\alpha 3$ (parental: 61,63 %; resistent: 67,68 %) und $\beta 1$ (parental: 78,06 %; resistent: 61,37 %) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100 %) (Abbildung 78 a + b).

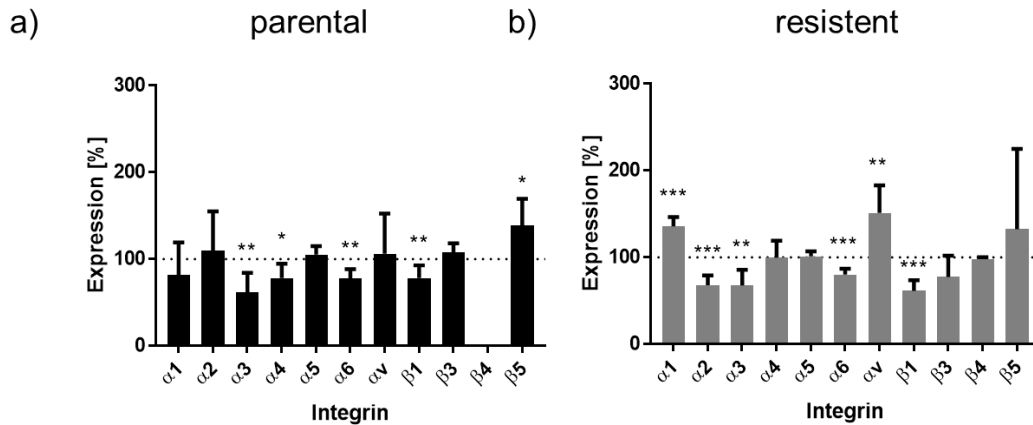


Abbildung 78: Integrin-Expressionsmuster der Zelllinie A-498 nach SHI-Behandlung. Parentale (a) und Sunitinib-resistente (b) A-498 Zellen nach einer Behandlung mit SHI [1 μ M] über 72 h. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 5.

3.5.4 Integrin-Blockadestudien

Die Behandlung von NZK-Zellen mit ART und SHI zeigte ein verändertes Integrin-Expressionsmuster (siehe 3.5.3). Unter Berücksichtigung der basalen Expression konnten die Integrin-Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\beta 3$ als mögliche Mediatoren in der Wirkung von ART und SHI identifiziert werden. Blockadestudien sollten vertiefend die funktionelle Relevanz der genannten Integrine überprüfen. Dabei lag auch hier der Fokus wieder auf den Zelllinien Caki-1 und 786-O.

3.5.4.1 Auswirkungen einer funktionellen Integrin-Blockade auf die Adhäsion

Da in den Caki-1 Zellen nur die parentalen Zellen eine signifikante Veränderung der Adhäsion nach ART-Behandlung zeigten, wurde nur diese und nicht die Sunitinib-resistente Zelllinie für die Blockadestudien verwendet. Parentale Caki-1 Zellen zeigen nach Integrin-Blockade von Subtyp $\alpha 3$, $\beta 1$ und $\beta 3$ eine signifikant gesteigerte unspezifische Adhäsion an Plastik (Abbildung 79 a). Auch die Adhäsion an Kollagen ist nach Blockade von Integrin $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\beta 3$ signifikant erhöht. Hingegen führt die Blockade von $\beta 1$ zu einer signifikant verringerten Adhäsion an Kollagen (39,8 %) (Abbildung 79 b). Die geringste Veränderung ist bei der Zellbindung an Fibronectin zu erkennen. Hier ist die Adhäsion nach der Blockade von

Integrin $\alpha 3$ und $\alpha 5$ erhöht (Abbildung 79 c). Die Adhäsion an HUVEC ist nach Blockade von Integrin $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\beta 3$ signifikant erhöht (Abbildung 79 d).

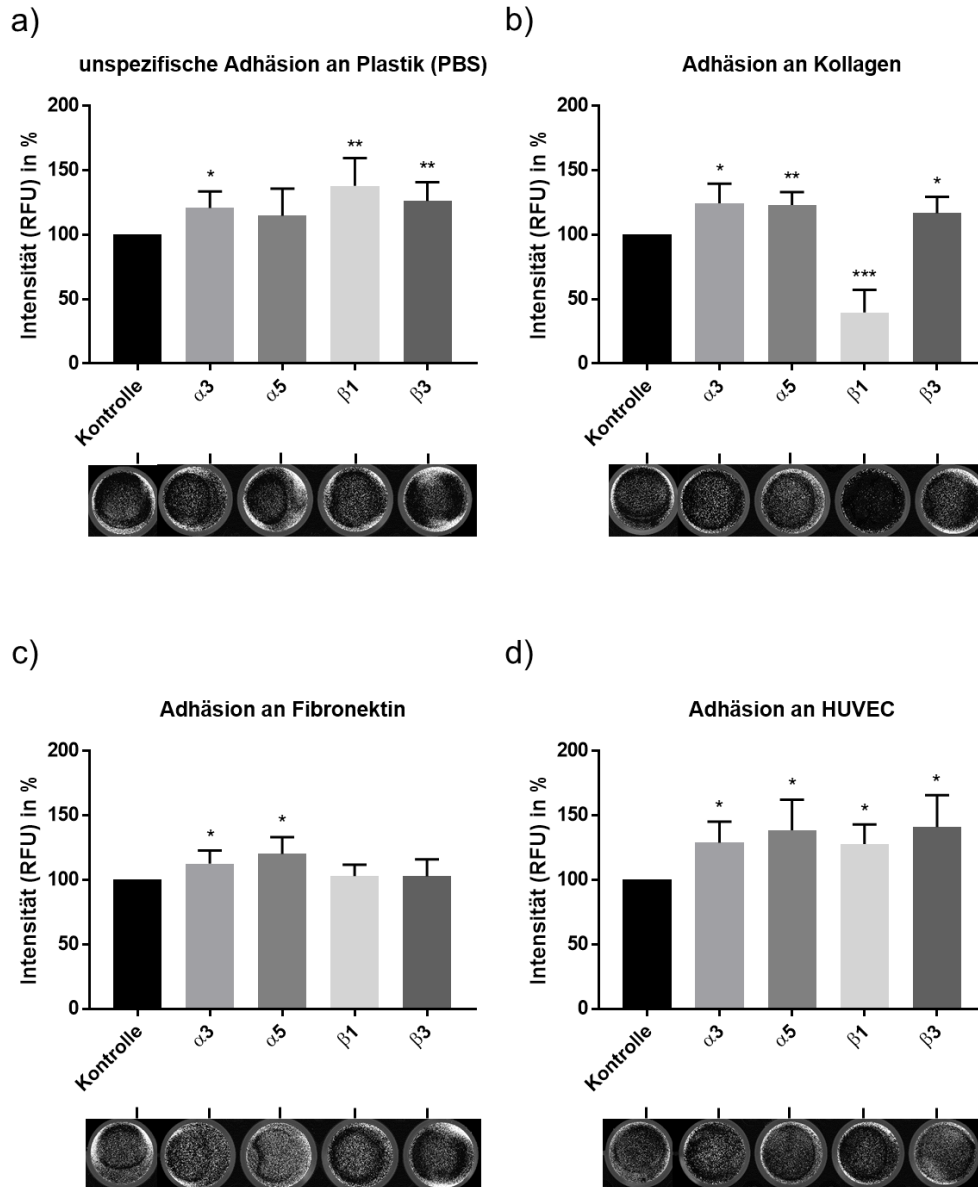


Abbildung 79: Adhäsion der parentalen Caki-1 Zellen nach Integrin-Blockade. Parentale Caki-1 Zellen blockiert mit funktionsblockierenden Antikörpern (1:100). Balkendiagramm und jeweils ein repräsentativer Versuch (a – d). Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 3.

Da in den 786-O Zellen nur die Sunitinib-resistenten Zellen eine signifikante Veränderung der Adhäsion nach ART-Behandlung zeigten, wurde hier entsprechend nur diese und nicht die parentale Zelllinie verwendet. Die Integrin-Blockade von Sunitinib-resistenten 786-O Zellen mündet in einer veränderten Zelladhäsion (Abbildung 80). So führt die Integrin $\alpha 3$ - und $\beta 1$ -Blockade zu einer gesteigerten unspezifischen Adhäsion (Plastik). Die Blockade von Integrin $\alpha 5$ zeigt hingegen eine verminderte unspezifische Adhäsion (Abbildung 80 a). Auch

die Bindung an Kollagen ist nach Integrin $\alpha 3$ -Blockade signifikant erhöht und durch die Blockade von Integrin $\alpha 5$ und $\beta 1$ signifikant reduziert (Abbildung 80 b). Die Adhäsion an Fibronektin ist nach Blockade von Integrin $\alpha 5$ und $\beta 3$ signifikant reduziert (Abbildung 80 c). Die Blockade von Integrin $\alpha 3$ und $\beta 1$ hingegen mündet in einer gesteigerten Adhäsion an HUVEC (Abbildung 80 d).

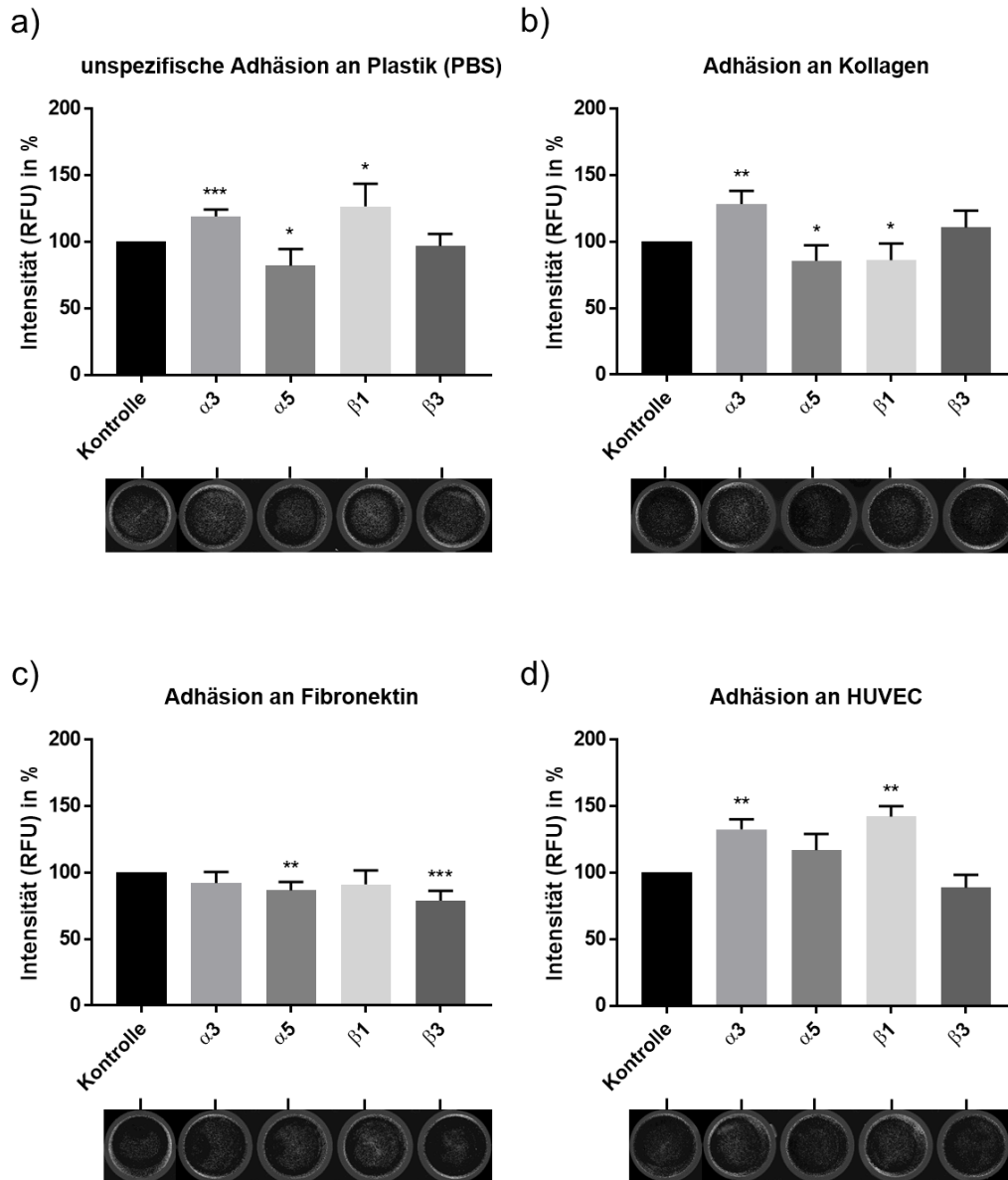


Abbildung 80: Adhäsion der Sunitinib-resistenten 786-O Zellen nach Integrin-Blockade. Sunitinib-resistente 786-O Zellen blockiert mit funktionsblockierenden Antikörpern (1:100). Balkendiagramm und jeweils ein repräsentativer Versuch (a – d). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 3.

3.5.4.2 Auswirkungen einer funktionellen Integrin-Blockade auf die Migration und Chemotaxis

Bei Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen mündet die Blockade von Integrin $\alpha 3$ und $\beta 3$ in einer signifikant reduzierten Migration (Abbildung 81 b). Auch die Chemotaxis wird durch die Blockade von Integrin $\alpha 3$ und $\beta 3$ signifikant inhibiert (Abbildung 81 d). Die Hemmung von Integrin $\alpha 5$ führt hingegen zu einer signifikant gesteigerten Chemotaxis (Abbildung 81 d). Die funktionelle Blockade der Integrine $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\beta 3$ zeigt wiederum keine Veränderung in der Migration und Chemotaxis von parentalen Caki-1 Zellen (Abbildung 81 a + c).

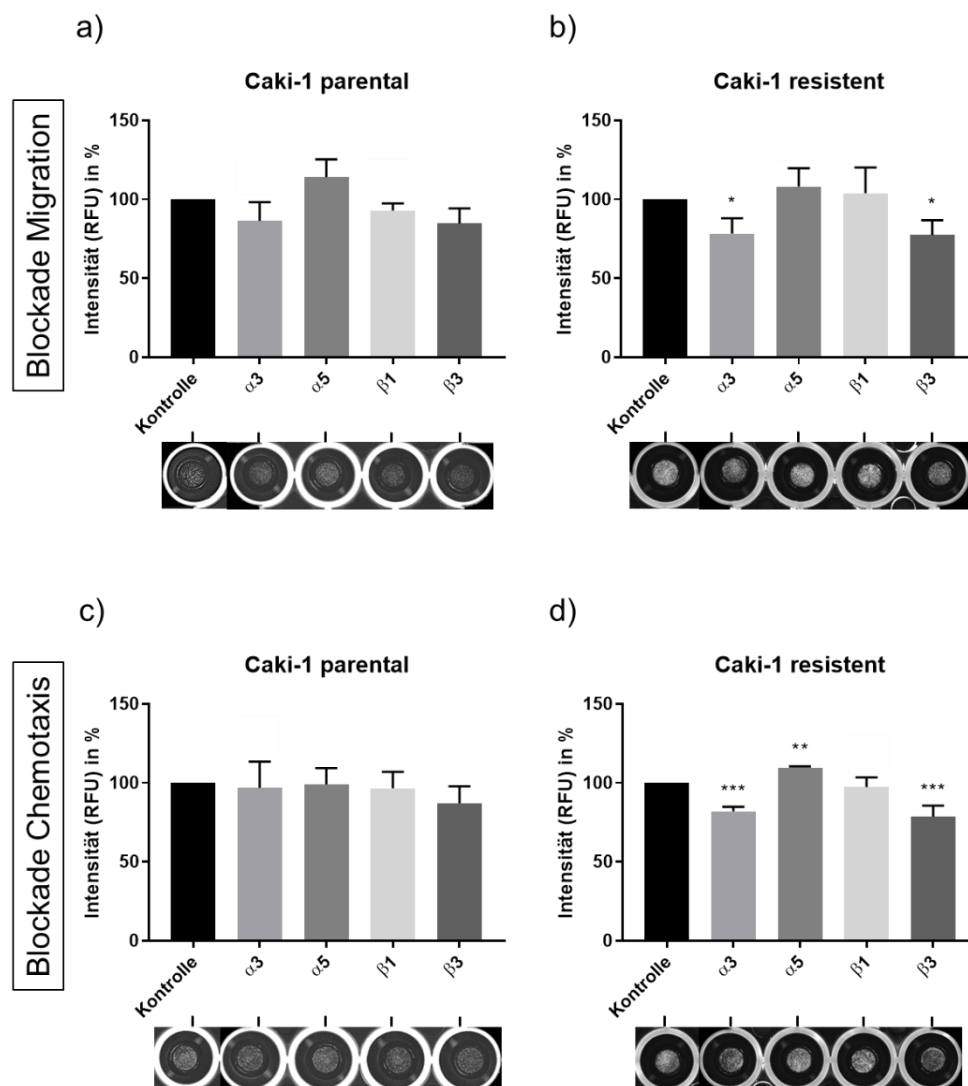


Abbildung 81: Migration und Chemotaxis der Caki-1 Zellen nach Integrin-Blockade. Parentale (a, c) und Sunitinib-resistente (b, d) Caki-1 Zellen über 24 h mit funktionsblockierenden Antikörpern (1:100) behandelt. Migration (a, b) und Chemotaxis (c, d) der Tumorzellen. Balkendiagramm und jeweils ein repräsentativer Versuch (a – d). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 3.

Bei parentalen 786-O Zellen resultiert die Blockade von Integrin $\alpha 3$ und $\beta 3$ in einer signifikant reduzierten Migration (Abbildung 82 a) und Chemotaxis (Abbildung 82 c). Bei Sunitinib-resistenten 786-O Zellen führt die Blockade der Integrine $\alpha 3$ und $\beta 3$ zu einer signifikant reduzierten Chemotaxis (Abbildung 82 d) und von Integrin $\beta 3$ zu einer signifikant gehemmten Migration (Abbildung 82 b). Die Blockade von Integrin $\beta 1$ zeigt ausschließlich in Sunitinib-resistenten 786-O Zellen eine signifikante Reduktion der Chemotaxis (Abbildung 82 d). Die funktionelle Blockade von Integrin $\alpha 5$ zeigt hingegen weder bei parentalen noch bei Sunitinib-resistenten 786-O Zellen eine Veränderung in der Migration oder Chemotaxis (Abbildung 82 a – d).

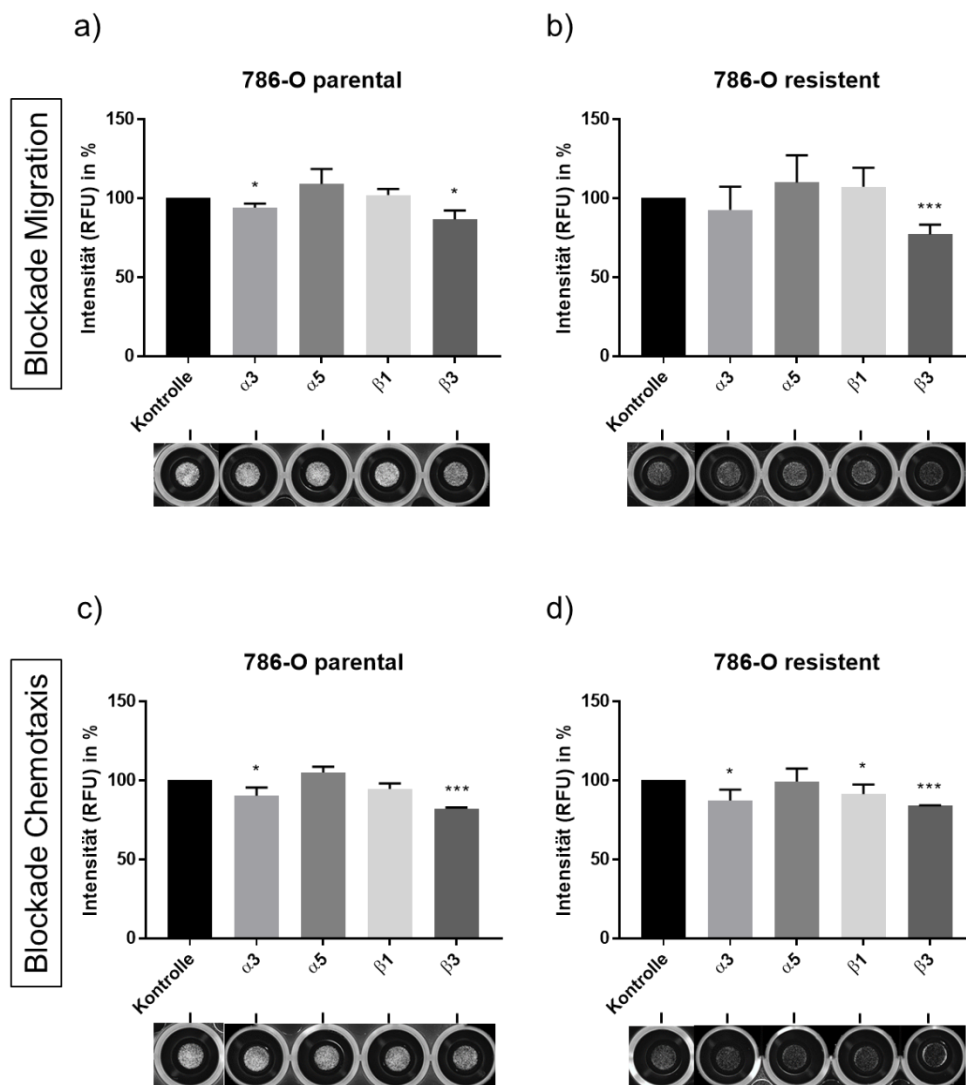


Abbildung 82: Migration und Chemotaxis der 786-O Zellen nach Integrin-Blockade. Parentale (a, c) und Sunitinib-resistente (b, d) 786-O Zellen über 24 h mit funktionsblockierenden Antikörpern (1:100) behandelt. Migration (a, b) und Chemotaxis (c, d) der Tumorzellen. Balkendiagramm und jeweils ein repräsentativer Versuch (a – d). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (100 %). Fehlerbalken = Mittelwert der Standardabweichung (\pm SD). Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. n = 3.

4 Diskussion

Das NZK zählt zu den aggressivsten urologischen Tumoren. Im fortgeschrittenen, metastasierten Zustand ist eine Heilung selten. Zielgerichtete Standardtherapien zeigen zunächst einen signifikanten Anstieg des Überlebens, münden jedoch in Resistenzen und sind daher von einem palliativen Charakter geprägt (67). Sunitinib, ein TKI, findet dabei als Erstlinientherapeutikum häufig Anwendung (67, 207) und bildete die Grundlage des hier verwendeten Resistenzmodells. Die bestehende Resistenzproblematik und damit die Behandlungslimitierung verdeutlichen den Bedarf an neuen Therapieoptionen deutlich. Der halbsynthetische Arzneistoff ART und der sekundäre Pflanzenstoff SHI induzierten bereits antitumorale Effekte in verschiedenen Tumorentitäten (208-213). Die Datenlage beim NZK ist jedoch lückenhaft und beim therapieresistenten NZK nicht vorhanden. In der hier vorgestellten Studie sollte daher untersucht werden, inwiefern ART und SHI für therapiesensitive (parentale) aber insbesondere auch Sunitinib-resistente NZK eine Therapieoption darstellen könnten.

4.1 Sunitinib-Resistenz

Die Wirkung von ART und SHI wurde im parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellkulturmodell untersucht. Eine Therapieresistenz der Zellen, induziert durch eine chronische Sunitinib-Behandlung, wurde mittels Dosis-Wirkungskurven nachgewiesen. Die NZK-Zellen wurden dabei als Sunitinib-resistent bezeichnet, wenn das Ansprechen auf Sunitinib in den chronisch behandelten NZK-Zellen gegenüber den parentalen eine konzentrationsabhängige Verschiebung aufwies, die mit mindestens einer Verdoppelung des IC_{50} (= Inhibition des Zellwachstums um 50 % innerhalb des ausgewählten Konzentrationsbereiches) einherging. Alle klarzelligen NZK-Zelllinien (Caki-1, 786-O und KTCTL-26) erfüllten diese Vorgabe und standen als Resistenzmodell für weitere Versuche mit ART und SHI zur Verfügung. Die chronisch mit Sunitinib behandelten A-498 Zellen hielten den Kriterien nicht vollumfänglich stand, allerdings sprachen sie ebenfalls signifikant später an und zeigten eine nahezu 2-fach geringere Sensitivität für das Medikament gegenüber den parentalen Zellen. Deshalb wurden die A-498 Zellen als Referenzzelllinie für weitere Versuchsreihen miteinbezogen.

Insgesamt scheint eine initial höhere Sensitivität therapiesensitiver Zellen gegenüber Sunitinib nach chronischer Sunitinib-Applikation in einer stark ausgeprägten Resistenz zu resultieren. So zeigten die gegenüber Sunitinib besonders sensitiven Caki-1 Zellen nach chronischer Sunitinib-Gabe ein nahezu 10-fach geringes Ansprechen im Vergleich zu den parentalen Pendanten. Anders die A-498 Zellen, die initial bereits deutlich schlechter auf

Sunitinib ansprechen und nach chronischer Sunitinib-Applikation lediglich einen ca. 2-fach erhöhten IC_{50} aufwiesen.

Auch andere Arbeitsgruppen konnten bereits Resistenzen gegen Sunitinib induzieren. Die resistenzinduzierende Konzentration lag in einem Bereich zwischen 1 – 10 μ M Sunitinib (112, 191, 214). Die chronische Gabe von Sunitinib [1 μ M] über 8 Wochen konnte dabei bereits bei den Zelllinien Caki-1, KTCTL-26 und A-498 zu einer Resistenz führen (191). Eine Arbeitsgruppe aus Kanada zeigte die Resistenzentstehung mit gleicher Konzentration nach 8 Wochen in der Zelllinie 786-O (215). Weitere Studien demonstrierten mittels Wachstumskurven, dass eine Sunitinib-Resistenz in NZK-Zelllinien bis zu einer Konzentration von 10 μ M induziert werden kann (216, 217).

4.2 ART zeigt eine antitumorale Wirkung in parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen

4.2.1 ART reduziert das Wachstum von parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen

Anhand von Dosis-Wirkungskurven wurde das Wirkspektrum von ART in parentalen und Sunitinib-resistenten Zellen bestimmt und so die optimalen Konzentrationen für die weiteren Versuchsreihen ermittelt. Alle parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen sprachen zeit- und dosisabhängig mit einer Wachstumsinhibition auf ART an. Der größte Effekt zeigte sich dabei nach der Inkubation über 72 h und die stärkste Reduktion war in KTCTL-26 Zellen zu verzeichnen. Hier stagnierte die Zellzahl nach ART-Behandlung nicht nur, sondern nahm mit den höchsten ART-Konzentrationen deutlich ab. Caki-1, 786-O und A-498 zeigten ebenfalls eine signifikante Reduktion des Wachstums, wurden anders als die KTCTL-26 jedoch nicht über die Ausgangszellzahl hinaus reduziert. Unter Betrachtung des IC₅₀-Wertes reagierten von diesen drei NZK-Zelllinien die 786-O Zellen am sensitivsten auf ART.

Interessanterweise reagierten somit die Zelllinien 786-O und KTCTL-26, beide generiert aus Primärtumoren (*Primarius*), im Zellwachstum am sensitivsten auf eine ART-Behandlung. Die Unterschiede zwischen Sunitinib-sensitiven und -resistenten NZK-Zellen einer Zelllinie im Ansprechen auf ART waren allgemein marginal und beruhten hauptsächlich darauf, dass die parentalen Zellen insgesamt ein leicht stärkeres Wachstum zeigten. Ein Mechanismus involviert in die Therapieresistenzen des NZK ist das Ausschleusen von Stoffen durch ABC-Transporterproteine (114). Dies setzt die lysosomale Sequestration von Stoffen voraus und resultiert in einem gesteigerten autophagischen Flux. Dieser Mechanismus ist u. a. für die native Resistenz gegenüber Chemotherapeutika mitverantwortlich. Das homogene Ansprechen auf ART von parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen lässt vermuten, dass ART davon nicht betroffen ist. Auch andere Arbeiten an therapiesensitiven NZK-Zellen stellten heraus, dass ART nach einer Inkubationszeit von 48 und 72 h seine wachstumsinhibierende Wirkung entfalten konnte und vor allem im zweistelligen mikromolaren Bereich bis 50 µM wirkt (148). Hierbei konnte eine ähnliche Reduktion des Zellwachstums nach 72 h wie in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden (148). Die zusätzliche Gabe von Sorafenib, einem TKI wie Sunitinib, potenzierte den Effekt weiter (148). Die Behandlung von Harnblasenkarzinomzellen mit ART resultierte ebenfalls in einem reduzierten Zellwachstum (218). Hier konnte ART das Wachstum von Zellen inhibieren, die gegen das Chemotherapeutikum Cisplatin resistent waren (218). Eine Wachstumsreduktion nach 72 h ART-Behandlung konnte auch an verschiedenen Magenkrebszelllinien gezeigt werden (211). In guter Übereinstimmung zur vorliegenden Arbeit wurde die Zellviabilität nicht

vollständig reduziert, obwohl Dosen bis zu ca. 400 μM (160 mg/l) Anwendung fanden (211). Des Weiteren zeigten Zelllinien aus Knochentumoren ein empfindliches Ansprechen auf ART hinsichtlich ihres Wachstums (219). Hier reagierte eine der getesteten Zelllinie sehr sensitiv auf die ART-Gabe, mit einer Inhibition des Wachstums gegen Null, ähnlich wie die KTCTL-26 Zellen in der hier präsentierten Studie. In den Knochentumorzellen ging dies mit einer gesteigerten Anzahl der apoptotischen Zellen einher (219). In einer Studie an Brustkrebszellen wurde der wachstumshemmende Effekte von ART bis zu einer Konzentration von ca. 500 μM gezeigt (212). Für die vertiefenden Versuchsreihen wurden jedoch ART-Konzentrationen zwischen ca. 65 μM (25 $\mu\text{g/ml}$) und ca. 195 μM (75 $\mu\text{g/ml}$) gewählt (212). Eine weitere Arbeit zu Brustkrebszelllinien definierte hingegen einen Konzentrationsbereich zwischen 25 und 100 μM ART für die Wachstumsanalysen (220). Die Studie war von einer heterogenen Sensitivität der Zelllinien geprägt, die bei den „triple-negativen“-Zellen, welche einen besonders aggressiven Tumor repräsentieren, am höchsten war (220). In Lungenkrebszellen reduzierte ART das Wachstum in einem Wirkspektrum bis 100 μM über 96 h (221). Die Inhibition korrelierte mit einer verringerten Expression des Wachstumsfaktorrezeptors EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) (221). Die Autoren konnten das Ergebnis außerdem auf ein Xenograft-Modell übertragen (221). In Bezug auf den EGFR zeigten Patientenstudien, dass beim klarzelligem NZK im Vergleich zum Normalgewebe der EGFR signifikant erhöht vorliegt und somit einen Therapieansatz bieten könnte (222). ART könnte somit auch aus diesem Grund ein vielversprechendes Therapeutikum für das NZK darstellen. Weiterführende Untersuchungen müssen dies klären. Das sehr sensitive Ansprechen von NZK-Zellen auf ART, im Literaturvergleich zu anderen Tumorentitäten, könnte für den Einsatz als spätere Therapieoption einige Vorteile implizieren. So sind die ermittelten Konzentrationen auch unter physiologischen Bedingungen zu erreichen. Eine pharmakologische Studie am Hausschwein (*Sus scrofa domesticus*) dokumentierte eine maximale Serumkonzentration von 13,8 μM nach einer 60 mg intravenösen ART-Gabe (223). Dabei wurde ART in einer Dosierung verabreicht, die an die Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für die Malariatherapie angelehnt war (223, 224). Intravenös werden bei einer komplizierten Malariainfektion bis zu 5 Dosen ART (2,4 mg/kg Körpergewicht) über 72 h verabreicht (225). Eine Toxizitätsanalyse zur intravenösen Gabe von ART an Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren konnte dabei eine gute Verträglichkeit nachweisen (226). Die Autoren empfahlen, dass eine tolerierbare ART-Gabe von 18 mg/kg Körpergewicht in einem 3-wöchigen Zyklus für eine Phase II Studie angestrebt werden kann. Neben der Verträglichkeit der Dosis wurde außerdem die Serumkonzentration der behandelten Patienten von ART analysiert (226). Diese entsprach bei einer Dosis von 18 mg/kg Körpergewicht 1,46 μM und liegt in dem Bereich, der auch in den Zellkulturexperimenten Anwendung findet (226). Auch wenn unklar

ist, welche Konzentrationen in soliden Tumoren *in vivo* erreicht werden können, handelte es sich um eine Dosis, die postoperativ zur Vermeidung eines erneuten Tumorprogresses beitragen könnte.

4.2.2 ART reduziert die Proliferation von parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen

Neben der Inhibition des Zellwachstums entfaltete ART auch eine antiproliferative Wirkung. So wurde die Zellteilung aller parentaler und Sunitinib-resistenter Zelllinien signifikant von ART inhibiert. Wie schon in den vorangegangenen Wachstumsstudien, war die hemmende Wirkung von ART zeit- und dosisabhängig. Die Hemmung der Proliferation in den Caki-1, 786-O und KTCTL-26 Zellen war bereits nach 24-stündiger ART-Inkubation signifikant, nahm nach 48 h weiter zu und erreichte den stärksten Effekte nach 72 h. Auch hier war das Ansprechen der untersuchten Zelllinien gegenüber ART heterogen. Am sensitivsten auf ART antworteten wieder parentale KTCTL-26 Zellen, bei denen die Proliferation auf nahezu Null gesenkt werden konnte. Das Sunitinib-resistente Pendant reagierte mit einer reduzierten Proliferation auf ART, die der Proliferation der anderen Zelllinien entsprach. Parentale und Sunitinib-resistente Caki-1 und 786-O Zellen zeigten nach einer Behandlung mit 10 μM ART über 48 h bereits eine signifikante Verminderung der Proliferation. Die Behandlung der Zelllinie A-498 hingegen mündete erst nach 72 h bei parentalen Zellen in einer signifikanten Reduktion. Die Sunitinib-resistenten A-498 Zellen sprachen zwar signifikant nach 48 h an, der Effekt war jedoch nur gering. Die Ergebnisse spiegeln somit sehr gut die Resultate des Zellwachstums wieder.

Auch in anderen Tumorentitäten konnte eine antiproliferative Wirkung von ART nachgewiesen werden. Die Behandlung von Ovarialkarzinomzellen mit ART mündete ebenfalls in einer verringerten Proliferation (213). In Chemotherapie-sensitiven und -resistenten Schilddrüsenkarzinomzellen wirkte ART zudem auch signifikant antiproliferativ auf therapieresistente Zellen (227). Auch in therapiesensitiven und Cisplatin-resistenten Harnblasenkarzinomzellen konnte die antiproliferative Wirkung von ART gezeigt werden (218). Eine besondere Sensitivität auf Artemisinin, dessen Derivat ART ist, zeigten Magenkrebszelllinien (228). Dort konnte der Wirkstoff ab 0,5 μM die Zellteilung signifikant senken, bedingt durch eine Hochregulation des Tumorsuppressors p53 (228). In klinischen Studien wurde die antiproliferative Wirkung auch *in vivo* deutlich (146). Vergleichend zur Placebo-Gruppe zeigten mit ART behandelte Kolonkarzinompatienten einen verringerten Erkrankungsprogress (146). Eine zeitabhängige Inhibition der Proliferation durch ART konnte ebenfalls an Hämangioendotheliumzellen aufgezeigt werden (229). Hier stellte sich interessanterweise heraus, dass ART über 72 h auch die Transkription und Expression von Proteinen senkt, die maßgeblich für den Progress beim NZK verantwortlich sind (229). Dazu

gehörten VEGF-A, VEGFR1, VEGFR2 und HIF-1 α (229). Wie beim NZK handelt es sich beim Hämangioendotheliom um einen vaskulären Tumor (230). Die Autoren postulierten daher, dass ART eine Therapieoption für alle vaskulären Tumore, somit auch für das NZK, bilden könnte (229). Neben Zellkulturexperimenten konnte die antiproliferative Wirkung von ART auf Hämangioendotheliomzellen auch im Mausmodell nachgewiesen werden, wo es zu einer deutlichen Verringerung der Tumorgroße kam (229).

4.2.3 ART hemmt das klonogene Wachstum von parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen

Weitere Aufschlüsse über das Zellwachstum ergaben Analysen zum klonogenen Wachstum. Die längere Inkubation ergab zusätzliche Informationen über eine Langzeitwirkung von ART auf das Potenzial der NZK-Zellen, aus Einzelzellen neue Kolonien auszubilden. So konnte neben dem Wachstumsverhalten nach längerer ART-Behandlung weiterhin das Metastasierungspotenzial der NZK-Einzelzellen abgeleitet werden. Die zuvor beobachtete dosisabhängige Wirkung von ART war auch beim klonogenen Wachstum zu erkennen. Die Inkubation über 10 Tage potenzierte den Effekt dabei weiter, sodass bereits nach einer Behandlung mit 10 μ M in allen Zelllinien eine signifikante Reduktion der Zellkolonien detektiert werden konnte. Auch hier zeigten die parentalen KTCTL-26 Zellen die höchste Sensitivität gegenüber ART. A-498 sprachen im klonogenen Wachstum ebenfalls sehr sensitiv an. Eine signifikante Reduktion des klonogenen Wachstums durch ART konnte bereits beim therapiesensitiven NZK beobachtet werden (148). Dazu reichte die Behandlung der Zelllinien Caki-1 und 786-O mit 5 μ M ART aus (148). Aber nicht nur ART, sondern auch der ursprüngliche sekundäre Pflanzenstoff Artemisinin reduzierte in einer weiteren Arbeit zum NZK das klonogene Wachstum signifikant (231). Dies war dabei auf die negative Regulation von AKT und die Erhöhung der Expression von E-Cadherin zurückzuführen (231). Studien zum NZK belegen, dass eine geringe E-Cadherin-Expression mit einer schlechten Prognose und Tumorprogress einhergehen (232). Da eine AKT-Hochregulation und ein Verlust von E-Cadherin bereits in therapieresistenten NZK-Zellen nachgewiesen wurde (129, 191, 233-235), ist es denkbar, dass diese Proteine auch in den Sunitinib-resistenten NZK-Zellen durch ART beeinflusst werden. In der Tat konnten weiterführende Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe zeigen, dass Proteine des AKT/mTOR-Signalwegs durch ART signifikant gehemmt werden (unpublizierte Daten).

4.2.4 Die Behandlung mit ART führt zu einem G0/G1-Zellzyklusarrest

ART reduzierte in parentalen und Sunitinib-resistenten Caki-1, 786-O, KTCTL-26 und A-498 Zellen signifikant das Wachstum, die Proliferation und das klonogene Wachstum. Dieser hemmende Effekt basierte zumindest anteilig auf einem Zellzyklusarrest. ART vermochte dabei in den NZK-Zellen einen signifikanten Anstieg an Zellen in der G0/G1-Phase hervorzurufen. Lediglich parentale KTCTL-26 Zellen zeigten keine Veränderung im Zellzyklus. In den Sunitinib-resistenten Schwesterzellen zeigte ART hingegen ebenfalls einen signifikanten Anstieg an Zellen in der G0/G1-Phase. Ein durch ART und andere Derivate von Artemisinin induzierter Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase wurde bereits mehrfach in unterschiedlichen Tumorentitäten beschrieben (236, 237). So führte die ART-Behandlung von Epidermoidkarzinomzellen zu einem Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase (236). Auch induzierte in Zellkulturen aus Tumoren des Endometriums die Gabe von Artemisinin einen Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase (237). Abweichend dazu konnte an den therapiesensitiven NZK-Zelllinien Caki-1 und 786-O gezeigt werden, dass eine 48 h Behandlung mit 50 µM ART einen Arrest in der G2/M-Phase begünstigte (148). Das Ergebnis folgte nicht den in dieser Arbeit am NZK erhobenen Daten. Ein Grund dafür könnte die höhere ART-Konzentration sein, die zu einer Verschiebung von einem G0/G1-Phase- zu einem G2/M-Phase-Arrest führt. Passend dazu zeigte eine Studie an Brustkrebszelllinien einen ROS-abhängigen Zellzyklusarrest (220). Dosisabhängig erfolgte hier durch ART ein Zellzyklusarrest in der G0/G1- oder G2/M-Phase (220). So führte eine geringe ART-Dosis [25 µM] zum G0/G1-Phase-Arrest, eine höhere Konzentration von 50 µM ART jedoch zum G2/M-Phase-Arrest (220). Eine ähnliche konzentrationsabhängige Wirkung ist auch beim NZK denkbar.

Ein durch ART-induzierter Zellzyklusarrest konnte beim NZK auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die Western-Blot-Analyse ergab Veränderungen in der Expression der regulatorischen Proteine des Zellzyklus infolge der Exposition mit ART. ART beeinflusste dabei die Expression von regulatorischen Proteinen, die an den verschiedenen Zellzyklusphasen beteiligt sind. So kam es durch ART zu einer signifikanten Inhibition von CDK1/2 und Cyclin A/B, welche verantwortlich für den S- und G2/M-Phase-Progress sind. Die NZK-Zellen treten somit nicht mehr in die S- und G2/M-Phase ein und verbleiben vermehrt in der G0/G1-Phase. Der Komplex aus CDK2 und Cyclin A initiiert die DNA-Replikation in der S-Phase (238). Der *Mitosis-promoting Factor* (MPF), bestehend aus Cyclin B im Komplex mit CDK1, ist hingegen verantwortlich für den Übergang von der G2-Phase in die Mitose-Phase (239). CDK1 ist dabei konstitutiv vorhanden, Cyclin B steigt von der S-Phase an und fällt nach vollzogener Mitose ab (239). In einer bereits publizierten Arbeit am NZK wurde gezeigt, dass die Herunterregulation von CDK1/2 und Cyclin A/B das

Zellwachstum signifikant senken kann (127, 133). Hier wurden ebenfalls die Zelllinien Caki-1, KTCTL-26 und A-498 untersucht (127, 133). Die Blockade von CDK1/2, Cyclin A und Cyclin B durch *Small Interfering RNA* (siRNA) resultierte dabei in einer signifikanten Wachstumsinhibition (127, 133). *In vitro* resultierte die Behandlung mit ART in Epidermoidkrebszellen in einem G0/G1-Arrest, der mit einer Herunterregulation von Cyclin A1, Cyclin B und CDK2 sowie Cyclin D1, CDK4 und 6 assoziiert war (236). Der Zellzyklusarrest korrelierte hier weiterhin mit einer gesteigerten p21- und p27-Expression, die mit einer eiseninduzierten mitochondrialen Apoptose einhergingen (236).

In guter Übereinstimmung konnte nach ART-Behandlung auch in der vorliegenden Studie neben der Reduktion der zellzyklusaktivierenden Proteine eine erhöhte Expression der zellzyklushemmenden Proteine p21 bei Sunitinib-resistenten 786-O Zellen und p27 bei parentalen und Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen nachgewiesen werden. Beide Proteine sind Tumorsuppressoren und könnten mitverantwortlich für die Induktion des Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase sein (240, 241).

4.2.5 ART induziert apoptotische Effekte

Neben einem Zellzyklusarrest können Zelltodereignisse für ein durch ART vermindertes Wachstum verantwortlich sein (143, 242, 243). Deshalb wurde vertiefend analysiert, inwiefern ART diese auch beim NZK zu induzieren vermag. Lediglich die ART-Behandlung Sunitinib-resistenter Caki-1 Zellen führte zu einem signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen. Die parentalen Caki-1 Zellen zeigten dies in Tendenzen. Die Behandlung mit ART zeigte keine Zunahme apoptotischer Zellen in den Zelllinien 786-O, KTCTL-26 und A-498. In guter Übereinstimmung konnte eine Studie mit therapiesensitiven Caki-1 und 786-O Zellen ebenfalls keine signifikanten apoptotischen Effekte nach einer 48-stündigen Inkubation mit ART [50 µM] zeigen (148). Dass ART die Apoptose in Tumorzellen induzieren kann, zeigten Studien an Tumorzellen des Magens, allerdings mit deutlich höheren Konzentrationen von 50 – 200 µM ART (211).

Die Untersuchungen belegen, dass die Induktion apoptotischer Effekte durch ART beim NZK eher eine untergeordnete Rolle einnimmt. Basierend auf den Wachstumsanalysen wäre zu erwarten gewesen, dass ART bei den parentalen KTCTL-26 Zellen einen Zelltod wie die Apoptose induziert, da diese keinen Zellzyklusarrest aufwiesen. In der Tendenz ist dies bei parentalen KTCTL-26 Zellen zu erkennen, dies kann jedoch nicht die beobachtete deutliche Wachstumsinhibition erklären. Vorstellbar ist, dass ART hier andere Zelltodarten als die Apoptose hervorruft.

4.2.6 ART induziert zelltypspezifisch die Ferroptose

In der Tat gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass ART auch einen eisenabhängigen Zelltod, die Ferroptose, hervorrufen kann (151-153). In der vorliegenden Studie konnten Untersuchungen zur Ferroptose belegen, dass insbesondere die KTCTL-26 Zellen auf eine ART-Behandlung mit ferroptotischen Ereignissen ansprechen. Auch in den 786-O Zellen löste die 48-stündige ART-Behandlung teilweise ferroptotische Effekte aus. Eine Ferroptose-Induktion ließ sich weiterhin partiell in parentalen Caki-1 Zellen nach 48 h ART-Gabe detektieren. A-498 Zellen zeigten keine Ferroptose als Antwort auf ART. Tatsächlich zeigten neben den KTCTL-26 Zellen auch die 786-O Zellen insgesamt sehr sensitiv wachstumshemmende Effekte. Diese basieren in den KTCTL-26 Zellen vorwiegend auf einer Ferroptose-Induktion. In den 786-O Zellen ist der Effekt, zumindest partiell, auf eine ART-induzierte Ferroptose zurückzuführen, wenn auch in deutlich schwächerer Ausprägung. Auch bei nicht-urologischen Tumorentitäten bewirkte die ART-Behandlung ferroptotische Effekte. In Zellkulturen von Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs (244) und in Pankreaskarzinomzellen (153) konnten ferroptotische Effekte nach einer ART-Behandlung gezeigt werden. Beim hepatozellulären Karzinom der Leber war die additive Gabe eines TKI, in diesem Fall von Sorafenib, nötig, um die Ferroptose zu induzieren (149). Gemeinsamkeiten bestehen zwischen den beiden Ferroptose-positiven KTCTL-26 und den 786-O Zellen. 786-O werden als *VHL*-mutiert beschrieben, hingegen der *VHL*-Status der Zelllinie KTCTL-26 nicht eindeutig definiert ist. Jedoch repräsentiert die Zelllinie KTCTL-26 das klarzellige NZK, das häufig durch eine *VHL*-Mutation oder -Verlust geprägt ist (245). Ein mutiertes *VHL*-Gen könnte ein Grund für die Induktion der Ferroptose sein und einen prädiktiven Marker darstellen. Eine Publikation wies besonders den klarzelligen, GPX4-abhängigen Tumoren die Fähigkeit zu, die Ferroptose zu induzieren (246). Ein fehlerhaftes *VHL*-Protein schien dies, zumindest teilweise, zu verstärken (246). So konnte die Ferroptose in einer Studie bei NZK-Zellen mit defektem *VHL* induziert werden, jedoch nicht bei *VHL*-Wildtyp-transfizierten Zellen (247). Ein weiterer Marker für die Fähigkeit von Zellen die Ferroptose zu induzieren scheint das Protein p53 zu sein. In einem Vergleich der Zelllinien Caki-1, 786-O, KTCTL-26 und A-498 konnte das Protein p53 nur in der ferroptotisch aktiven Zelllinie KTCTL-26 detektiert werden (248). p53 wird eine Rolle als Ferroptose-Verstärker zugeschrieben (249, 250) und könnte somit das besonders gute Ansprechen der Zelllinie KTCTL-26 erklären. Abweichend davon könnten auch bei Caki-1 Zellen ferroptotische Effekte beteiligt sein. In der Literatur ist beschrieben, dass die Zelllinie Caki-1 Ferroptose-positiv ist (251) und somit der Effekt, zumindest anteilig, nicht auszuschließen ist. Anzumerken bleibt, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Sensitivität gegenüber einer Ferroptose-Induktion bei dieser Zelllinie nicht sehr ausgeprägt ist und diese mit der Therapieresistenz verloren geht.

Die hohe Spezifität von Ferrostatin-1, die Lipidperoxidation zu unterdrücken, reichte aus, um bei positivem Befund von der Ferroptose zu sprechen (252). Dennoch sollten weitere Versuche die gewonnenen Ergebnisse vertiefen und verifizieren. Dazu wurde die Zelllinie KTCTL-26 herangezogen, da diese im Versuchsdesign eindeutig als Ferroptose-positiv eingestuft werden konnte. Da es sich bei der Ferroptose um einen eisenabhängigen Zelltod handelt, sollte Eisen die Induktion der Ferroptose begünstigen. In guter Übereinstimmung konnte durch die zusätzliche Gabe von Eisen die ferroptotische Aktivität von ART verstärkt werden. So wurden Sunitinib-resistente KTCTL-26 Zellen, die weniger sensitiv auf die ART-Gabe reagierten, in Kombination mit holo-Transferrin stärker in ihrem Wachstum inhibiert. Das Glykoprotein Transferrin ist hauptsächlich für den Eisentransport verantwortlich. Das eisengebundene Transferrin (holo-Transferrin) erhöht dabei den Eisengehalt der Zellen. Die Behandlung mit ART könnte somit einen Vorteil in der Behandlung von schnellwachsenden Tumoren mit einem erhöhten Eisenmetabolismus darstellen. Tatsächlich zählt das NZK zu den Tumoren, die durch ein schnelles Wachstum und einen gesteigerten Eisenmetabolismus gekennzeichnet sind (253). Eine Arbeit an Pankreaskarzinomzellen zeigte eine ähnliche Wirkungsverstärkung von ART in Anwesenheit von Eisen (153). Dabei schien es zu einer lysosomalen Akkumulation von zweiwertigem Eisen zu kommen, das wiederum reaktiv mit ART interagiert (153). Auch in einer weiteren Studie an Brustkrebszelllinien bildete die Wirkpotenzierung durch Eisen in Kombination mit ART die Diskussionsgrundlage des dort gezeigten inhibitorischen Effekts von ART (143). Dass Eisen einen wirkungssteigernden Einfluss auf ART hat, zeigt Analogien zur eigentlichen Anwendung von ART in der Malariabehandlung auf (141). So kommt es auch bei dem parasitären Einzeller durch den Abbau von Hämoglobin zur Akkumulation von Eisen. Der antiparasitäre Effekt mündet u. a. in der Spaltung der labilen Endoperoxidgruppe von ART in Anwesenheit von Eisen und führt so zur Generierung von ROS, das wiederum DNA-Schäden hervorruft und in der Folge im Absterben der Parasiten resultiert (141).

Trolox, ein Vitamin E-Derivat und Antioxidans, konnte den Effekt von ART in KTCTL-26 Zellen signifikant revertieren. Die zusätzliche Behandlung mit Trolox indizierte somit die Beteiligung von ROS im Wirkmechanismus von ART in den KTCTL-26 Zellen und bestätigte weiter die Ferroptose-Induktion. In guter Übereinstimmung konnte auch in anderen Tumorentitäten die Wirkung von ART anteilig auf die Generierung von ROS zurückgeführt werden, wie z. B. in Brustkrebszelllinien (143). In T-Leukämie-Zellen führte die Gabe von ART ebenfalls zu einem ROS-induzierten Zelltod, allerdings bei gesteigerter Caspase 9- und 3-Aktivität (144). ART wirkte hier also über den mitochondrialen intrinsischen Weg (144) und nicht über eine Ferroptose. Auch beim hepatozellulären Karzinom zeigten neuere *in vitro*-Analysen, dass die ROS-Entstehung durch ART ein essentielles Element in der Induktion der mitochondrialen Apoptose darstellt (254).

In der vorliegenden Studie konnte die Generierung von ROS nach ART-Applikation weiterhin durch einen verringerten GSH-Anteil im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden. In der Kombination mit Eisen konnte der Effekt nochmals gesteigert werden. Ein GSH-Verbrauch resultiert in einem gesteigerten GSSG-Spiegel, dem Dimer des oxidierten GSH (255). In den Sunitinib-resistenten KTCTL-26 Zellen zeigte sich zwar eine signifikante Reduktion des GSH-Gehalts, jedoch weniger stark ausgeprägt als in den parentalen Zellen. Dies könnte auch die weniger starke Wirkung von ART auf das Wachstum Sunitinib-resistenter KTCTL-26 Zellen erklären. Möglich, dass die resistenten KTCTL-26 Zellen eine höhere ROS-Toleranz aufweisen. Proteomische Analysen scheinen diese These zu untermauern (256). So konnte in Sunitinib-resistenten 786-O Zellen ein 4- bis 5-fach gesteigerter GSH-Metabolismus gegenüber der parentalen Kontrolle gezeigt werden. Dieser war insbesondere durch einen Anstieg der Aminosäure Cystein und des Tripeptids GSH gekennzeichnet (256). Trotz allem konnte dieser Resistenzmechanismus in den hier gezeigten Sunitinib-resistenten KTCTL-26 Zellen keine Ferroptose-Intoleranz induzieren, sondern lediglich zu einer leichten Abschwächung der Ferroptose gegenüber den parentalen Zellen führen. Aufgrund der gewonnenen Daten ist es denkbar, dass eine additive ART-Gabe zur Erstlinientherapie mit TKI beim NZK einem gesteigerten GSH-Metabolismus und damit einem Resistenzmechanismus entgegenwirken könnte.

In guter Übereinstimmung damit konnte eine aktuelle Studie an Zellen des hepatozellulären Karzinoms zeigen, dass ART in Kombination mit Sorafenib, einem weiteren TKI, synergistisch wirken kann und zu einem signifikanten Anstieg von Zelltodereignissen führt (257). Tatsächlich wurde auch schon zuvor beschrieben, dass Sorafenib die Ferroptose induzieren kann (258). Auch in Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs resultierte die ART-Gabe *in vitro* in einem verminderten GSH-Gehalt (244). Auch hier war die ROS-Induktion durch das Antioxidans Trolox reversibel (244).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ART den Gehalt von xCT senkt und den von p53 erhöht (244). Die xCT-Aktivität ist dabei essentiell für die GSH-Synthese und die Aufrechterhaltung des Redox-Gleichgewichtes (259). Jiang und Mitarbeiter konnten wiederum zeigen, dass p53 den Cysteineinstrom hemmen und damit den GSH-Stoffwechsel stören kann (260). Darüber hinaus zeigten sie, dass in p53-defekten Zellen (durch Transfektion) keine Ferroptose induziert werden kann (260). In guter Übereinstimmung wurde in einem Screening zur p53-Expression in NZK-Zelllinien deutlich, dass nur die KTCTL-26 Zellen p53 exprimieren (248). Somit könnte die Expression von p53 für die anhaltende Ferroptose-Induktion in parentalen und Sunitinib-resistenten KTCTL-26 NZK-Zellen mitverantwortlich sein und einen Einfluss auf den GSH-Stoffwechsel haben (248).

p53 stellt damit möglicherweise einen prädiktiven Marker für eine effektive Ferroptose-Induktion dar (248).

In der zellulären Antwort auf oxidativen Stress fungiert das Protein GPX4 als Katalysator und Ferroptose-Regulator (261). In den parentalen und Sunitinib-resistenten KTCTL-26 Zellen wurde GPX4 nach ART-Gabe höchst signifikant reduziert exprimiert. Dies stützt weiter die bisherigen Ergebnisse zur Ferroptose-Induktion. Eine Überexpression von GPX4 konnte bei Darmkrebs in *in vitro*-Studien entsprechend umgekehrt die Ferroptose verhindern (262). Substanzen, die wie ART eine Endoperoxid-Verbindung enthalten, konnten GPX4 direkt hemmen und führten so zur Ferroptose (263). GPX4 ist dabei die natürliche Zellantwort auf eine Lipidperoxidation (151), die durch Ferrostatin-1 in den KTCTL-26 Zellen verhindert wurde und zu einer Aufhebung des wachstumshemmenden Effekts von ART führte. Ein Verlust des Antioxidans-Systems fördert entsprechend die Fähigkeit der Zellen die Ferroptose zu induzieren. Eine Arbeit zur Ferroptosesensitivität in Zelllinien unterschiedlicher Tumorentitäten konnte dies bestätigen (261). ART wirkt also offensichtlich über mehrere Mechanismen auf die Ferroptose ein. Zum einen führt ART zu einem eisenabhängigen Anstieg von ROS, zum anderen scheint es regulatorisch auf Proteine einzuwirken, die einen antioxidativen Effekt erzielen.

Neben den beschriebenen Effekten, konnten auch morphologische Veränderungen der Membran gezeigt werden. So führte die Behandlung mit ART zu einer deutlichen Vergrößerung des Zelllumens, welches mit Defekten der Zellmembran einherging. Partiiell waren Vesikel an der Membran zu erkennen, bei denen es sich um apoptotische Körperchen handeln könnte. Bei dem Apoptose-Test waren apoptotische Effekte in parentalen KTCTL-26 Zellen zumindest tendenziell gesteigert. Möglicherweise werden daher unterschiedliche Mechanismen aktiviert, die Ferroptose und die Apoptose. Eine Arbeit an Pankreaskrebszellen zeigte, dass ART sowohl die Ferroptose als auch die Apoptose zu induzieren vermag (264). Hier beschrieben die Autoren eine durch den *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) induzierte Apoptose. Die Autoren postulierten, dass diese der *p53 Upregulated Modulator of Apoptosis* (PUMA)-Achse geschuldet ist (264). NZK-Zellen konnten in einer Studie mit Nutlin-3, einem MDM2-Inhibitor, für eine TRAIL-induzierte Apoptose resensitiviert werden. Der MDM2-Inhibitor ist wiederum ein Aktivator für den Tumorsuppressor p53 (265). Parentale KTCTL-26 Zellen waren in den Messungen stark sensitiv für eine Ferroptose-Induktion. Die Behandlung von Sunitinib-resistenten KTCTL-26 Zellen mündete ebenfalls in signifikanten ferroptotischen Ereignissen, wenn auch im Vergleich zur parentalen Kontrolle etwas weniger ausgeprägt.

Indirekt könnte ein weiterer Mechanismus für das Ansprechen auch Sunitinib-resistenter NZK-Zellen mitverantwortlich sein. So bildet die lysosomale Akkumulation von Sunitinib im

Resistenzmechanismus einen entscheidenden Faktor. Sunitinib wird dabei in Lysosomen akkumuliert und stimuliert dort Proteine wie das ABCB1 (*ATP binding cassette subfamily B member 1*), die den Zellausfluss begünstigen (112). Die Arbeitsgruppe um Giuliano zeigte, dass die Hemmung von ABCB1 oder die Permeabilisierung der Lysosomenmembran zu einer Resensitivierung der Tumorzellen führt (112). Die durch die Ferroptose herbeigeführte Lipidperoxidation resultiert wiederum in einer Permeabilisierung der Zellmembran und der Organellen. Dies könnte der lysosomalen Akkumulation von Sunitinib entgegenwirken und somit das gute Ansprechen auf ART, auch der therapieresistenten Tumorzellen, erklären.

In Anbetracht der Daten ist davon auszugehen, dass bei Sunitinib-resistenten KTCTL-26 Zellen sowohl die Ferroptose als auch ein Zellzyklusarrest zur Inhibition des Zellwachstums führte. Insgesamt unterstreicht dies das heterogene Wirkspektrum von ART. Im Fall eines hohen ROS-Anstiegs scheint es eher ferroptotische Ereignisse zu induzieren, wohingegen eine geringe ROS-Last in einem Zellzyklusarrest resultiert.

4.2.7 ART beeinflusst die Adhäsion und Migration von parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen

Wichtig für die Tumorgenese und das Entstehen von Metastasen sind die Zelladhäsion sowie die migratorischen und invasiven Eigenschaften der Tumorzellen. Das fortgeschrittene NZK ist definiert durch das Vorliegen von Metastasen. Daher sollte ein möglicher Einfluss von ART auch auf das Migrationspotenzial der Tumorzelllinien untersucht werden. Die Behandlung mit ART führte bei parentalen Caki-1 Zellen zu einer signifikanten Reduktion adhärenter Zellen an Kollagen und Fibronectin. Die adhäsiven Eigenschaften waren insgesamt durch ART gehemmt, wie durch die unspezifische Anheftung an Plastik (Kontrolle mit PBS) gezeigt. Auch die Adhäsion von Sunitinib-resistenten 786-O Zellen ließ sich signifikant durch ART reduzieren. Vergleichbare Studien zum Anheftungsverhalten bei anderen Tumorentitäten nach ART-Behandlung sind bisher selten. Lediglich beim Leberzellkarzinom konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit ART im Zellkulturmodell ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Adhäsion an EZM-Proteine führte (266).

Neben der Adhäsion senkte ART auch die Migration und Chemotaxis der NZK-Zellen signifikant. Hier wurde die Wirkung von ART auf die Migration und Chemotaxis besonders in den Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen deutlich. Die mit ART behandelten parentalen Caki-1 Zellen zeigten hingegen eher ein geringes Ansprechen. Interessanterweise lag die basale Migration bei Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen im Schnitt 5–6 x höher als bei den parentalen Zellen. Da ART hauptsächlich die Migration der Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen signifikant senkte, könnte dies auf einen Mechanismus hindeuten, über den ART spezifisch die Tumorzellen angreift, die eine erhöhte migratorische Aktivität aufweisen. Auch

in parentalen 786-O Zellen mündete die ART-Gabe in einer signifikant reduzierten Migration, wohingegen bei der Adhäsion nur die Sunitinib-resistenten 786-O auf ART ansprachen. Im Wundheilungstest „*Scratchassay*“ konnte die inhibitorische Wirkung von ART auf die Motilität der Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen bestätigt werden. Auch hier migrierten die parentalen Caki-1 Zellen ca. 50 % weniger als die Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen.

Bei den 786-O Zellen konnte ART im Wundheilungstest hingegen sowohl die parentalen als auch Sunitinib-resistenten 786-O Zellen signifikant in der Motilität inhibieren. Im Vergleich zu den Caki-1 Zellen konnte hier eine hohe basale Motilität sowohl in parentalen als auch in Sunitinib-resistenten Zellen detektiert werden. Die Inhibition der Motilität durch ART scheint somit besonders bei einem aggressiven motilen Tumortyp Wirkung zu zeigen. Dass ART die Migration von Tumorzellen senkt, konnte auch bei anderen Tumorentitäten gezeigt werden. So reduzierte ART die Migration in hepatozellulären Karzinomzellen (266). Der Effekt konnte dabei durch die parallele Gabe von Sorafenib nochmals gesteigert werden (267). Eine weitere Studie an NZK-Zellen (Caki-2 und UMRC-2) konnte zeigen, dass die Behandlung mit Artemisinin, dem Ausgangsstoff von ART, zu einer verminderten Migration führt (231). Dies korrelierte mit einer signifikanten Erhöhung der mRNA (*messenger RNA*) von E-Cadherin, einen Differenzierungsmarker für den epithelialen Zelltyp (231). Der Anstieg ging einher mit einer signifikanten Reduktion von N-Cadherin, das wiederum einen Differenzierungsmarker für einen mesenchymalen Zelltyp darstellt (231). Ein wesentlicher Prozess in der Sunitinib-Resistenzentstehung ist die EMT (268). Der Prozess führt zu einer Depolarisierung der Zellmembran und mündet in einem mesenchymalen Zelltyp mit erhöhten migratorischen Eigenschaften (269, 270). Untersuchungen zeigten, dass dafür u. a. die pharmakologische Inhibition des VEGFR, wie z. B. durch TKI, mit einhergehender Aktivierung des EGFR zumindest mitverantwortlich ist (271). Die Reversion des Verlustes von E-Cadherin und der Zunahme von N-Cadherin, die mit der EMT einhergeht, könnte somit eine Re-Differenzierung bedeuten. Ein ähnlicher Umkehreffekt von ART ist auch in den fortgeschrittenen NZK-Zellen denkbar und sollte in weiterführenden Studien evaluiert werden.

4.2.8 ART verändert das Integrin-Expressionsmuster von parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen

Mitverantwortlich für die Bindung der Tumorzellen an die EZM-Proteine sind Integrine, Adhäsionsrezeptoren, deren funktionelle Einheit aus einer α - und β -Einheit besteht (272). Je nach Kombination der Untereinheiten zeigen diese eine unterschiedliche Bindungsaffinität. Die Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ in Kombination mit $\beta 1$ bilden z. B. den Liganden für Kollagen (272), $\alpha 5$ mit $\beta 1$ für Fibronektin (273). Integrine sind nicht nur Adhäsionsrezeptoren, sondern können als Transmembranproteine über Signalkaskaden auf das Zellüberleben, Zellwachstum, Migration und Invasion einwirken (274). Bei adhärenen Zellen stehen

Signalwege zum Zellüberleben und dem Zellwachstum im Vordergrund. Verlieren „normale“ adhärenzte Zellen die Fähigkeit zur Adhäsion oder zur Liganden-Bindung, können Caspasen aktiviert werden und es kommt zur Apoptose (275). Die Hemmung der adhäsiven und motilen Eigenschaften nach Behandlung der NZK-Zellen mit ART ging mit einer Modulation der Integrin-Untereinheiten einher. Somit könnte ein molekularer Zusammenhang zwischen ART-Gabe und verminderter Migration und Adhäsion bestehen. Basal exprimiert waren in den NZK-Zelllinien insbesondere die Integrin-Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\beta 3$. Auch andere Arbeiten zum NZK konnten die führende Expression der vier Integrin-Untereinheiten belegen (276).

Die basale Expression der Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen unterschied sich deutlich von den parentalen Caki-1 Zellen. So exprimierten die Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen signifikant mehr Integrin $\alpha 5$. Integrin $\alpha 5$ wird eine bedeutende Rolle im Metastasierungsprozess von klarzelligen NZK-Zellen zugeschrieben, in denen es hochreguliert vorliegt (277). Entsprechend führte die Blockade von Integrin $\alpha 5$ in einer Studie an Caki-1 Zellen zu einer verminderten Migration (277). Die Autoren postulierten daher, dass die Expression von Integrin $\alpha 5$ einen entscheidenden Faktor im Tumorprogress und in der Entwicklung von Metastasen darstellen könnte (277).

Unterschiede in der basalen Expression zwischen parentalen und Sunitinib-resistenten 786-O und A-498 Zellen konnten nicht detektiert werden. Jedoch wurden signifikante Unterschiede in der basalen Integrin-Expression zwischen parentalen und Sunitinib-resistenten KTCTL-26 Zellen deutlich. Dort lagen die Integrine $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\beta 3$ in Sunitinib-resistenten Zellen jedoch reduziert vor. Auch eine weitere Studie an NZK-Zellen konnte belegen, dass in Sunitinib-resistenten KTCTL-26 Zellen im Vergleich zu parentalen Zellen Integrin $\beta 3$ geringer exprimiert wird (278). Integrin $\beta 3$ gilt dabei als ein möglicher Mediator in der Zellmigration (279). Eine reduzierte Expression von $\alpha 3$ und $\beta 1$, im Fall der Sunitinib-resistenten KTCTL-26 Zellen, könnte für einen motileren, weniger adhärenzten Tumor sprechen. Das Dimer aus Integrin $\alpha 3\beta 1$ ist zur Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Verbindungen und den Aufbau des Zytoskeletts wichtig (280). Zumindest beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom führte der Knockdown vom Integrin $\alpha 3\beta 1$ zu einer erhöhten Proliferation und Migration von Zellen (281), Eigenschaften die auch vom Sunitinib-resistenten NZK zu erwarten sind. Aber auch in *in vivo*-Studien zum Brustkrebs korrelierte ein herunterreguliertes Integrin $\alpha 3\beta 1$ mit einer verstärkten Progression (282).

Durch die ART-Gabe wurden die Integrin-Untereinheiten zelltypspezifisch und z. T. in Abhängigkeit von der Sunitinib-Resistenz unterschiedlich reguliert.

So führte die Behandlung mit ART zu einer erhöhten Expression des Integrins $\alpha 3$ Sunitinib-resistenter Caki-1 Zellen. Parentale Zellen zeigten eine Erhöhung jedoch nur in der Tendenz. Weiterhin sprachen parentale und Sunitinib-resistente 786-O und KTCTL-26 Zellen mit einem erhöhten Integrin $\alpha 3$ auf ART an. Das Integrin $\alpha 3$ bildet mit dem Integrin $\beta 1$ einen Liganden für Fibronectin, Laminin und Kollagen (283). Eine erhöhte Integrin $\alpha 3\beta 1$ -Oberflächenexpression wird mit einer schlechten Prognose in verschiedenen Tumorentitäten beschrieben, wie beim papillären Schilddrüsenkarzinom (284). Auch in Proben von Gebärmutterhalskrebspatientinnen konnte eine erhöhte $\alpha 3$ -Expression nachgewiesen werden, welche mit einer schlechten Prognose korrelierte (285). Im dazugehörigen Zellkulturexperiment resultierte die Blockade des Integrins auf RNA-Ebene (Integrin $\alpha 3$ shRNA-Transfektion) in einer geringen Zellmotilität. In der vorliegenden Studie senkte ART jedoch die Zellmigration der NZK-Zellen. Es ist denkbar, dass in den Sunitinib-resistenten Caki-1 sowie parentalen und Sunitinib-resistenten 786-O Zellen die Akkumulation des Integrins $\alpha 3$ durch ART mit einem Funktionsverlust einhergeht. Schon in einer anderen Arbeit an Harnblasenkarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass sich die Funktion von Integrinen verändern kann (286). Auch in der Zelllinie A-498 konnte bei Sunitinib-resistenten Zellen eine Veränderung der Integrin $\alpha 3$ -Expression detektiert werden. Hier inhibierte die ART-Behandlung jedoch die Expression.

In der vorliegenden Arbeit inhibierte ART in den parentalen und Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen das Integrin $\alpha 5$ signifikant. Wie bereits erwähnt bilden die Integrin-Untereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 1$ einen heterodimeren Rezeptor für Fibronectin (273). Neben der Integrin-Regulation hemmte ART in parentalen Caki-1 Zellen auch die Adhäsion, u. a. an Fibronectin bei gleichzeitiger stärkerer Reduktion der Expression von Integrin $\alpha 5$. Hier könnte entsprechend die ART-bedingte Integrin-Inhibition eine reduzierte Adhäsion zur Folge haben. Im Fall der Zelllinie Caki-1 zeigte eine Studie, dass eine erhöhte Integrin $\alpha 5$ -Expression mit einer gesteigerten Tumoraggressivität einhergeht (277). Dass die ART-Behandlung in Caki-1 Zellen zu einer verminderten Integrin $\alpha 5$ -Expression führt, könnte umgekehrt für eine Reduktion der Tumoraggressivität durch ART sprechen.

In der Zelllinie 786-O konnte das Integrin $\alpha 5$ nur bei den Sunitinib-resistenten Zellen nach ART-Gabe moduliert werden. Hier resultierte die Behandlung in einer erhöhten Expression des Proteins. Auch in der Zelllinie KTCTL-26 und A-498 konnte eine erhöhte Proteinmenge des Integrins $\alpha 5$ detektiert werden, hier sowohl bei parentalen als auch Sunitinib-resistenten Zellen. Allerdings wurde in Gewebeproben besonders aggressiver NZK immunhistochemisch eine niedrige Integrin $\alpha 5$ -Expression nachgewiesen (287). Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete erhöhte Integrin $\alpha 5$ -Expression in den anderen Zelllinien könnte somit ebenfalls auf eine Reduktion der Tumoraggressivität durch ART hindeuten. Tatsächlich wurde bereits

postuliert, dass die Integrin-Expression und -Funktion zelltyp- und entitätspezifisch sind (288).

In parentalen Caki-1 Zellen konnte durch ART zudem eine Hemmung der Expression von Integrin $\beta 1$ beobachtet werden. Die Heterogenität der verschiedenen Zelllinien wurde auch hier deutlich. So lag Integrin $\beta 1$ nach ART-Gabe in den Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen signifikant erhöht vor. Auch in den beiden Zelllinien 786-O und KTCTL-26 führte die ART-Behandlung zu einer Steigerung von Integrin $\beta 1$ in den jeweils Sunitinib-resistenten Zellen. Interessanterweise zog die gesteigerte Expression von Integrin $\beta 1$ durch ART in den Sunitinib-resistenten Caki-1, 786-O und KTCTL-26 Zellen kein gesteigertes metastatisches Verhalten nach sich. Denkbar ist, dass Integrin $\beta 1$ nach ART-Gabe an der Zelloberfläche zwar verstärkt exprimiert, jedoch in seiner Funktion blockiert wird. Dies zeigte sich in Untersuchungen an embryonalen Rhabdomyosarkomzellen (289). Dort konnte nach ART-Gabe eine Überexpression von Integrin $\beta 1$ detektiert werden, die wiederum mit einer verringerten Migration einherging (289). In einer Studie an Brustkrebszelllinien konnte hingegen gezeigt werden, dass eine Überexpression von Integrin $\beta 1$ in Kombination mit dem Protein c-Met zu einer verstärkten Metastasierung führen kann (290). Wie Integrin $\beta 1$ jeweils wirkt, ist somit offensichtlich abhängig von der Tumorentität und/oder dem Zelltyp. Die basale Expression bzw. die basale Gesamtexpression des Integrinprofils könnte dabei eine Rolle spielen.

Die Behandlung mit ART resultierte bei parentalen Caki-1 Zellen weiterhin in einer erhöhten Expression des Integrins $\beta 3$. Sunitinib-resistente Caki-1 Zellen zeigten die Erhöhung nur in der Tendenz. In den beiden Zelllinien, 786-O und KTCTL-26, führte die ART-Behandlung sowohl in parentalen als auch Sunitinib-resistenten Zellen zu einer signifikanten Verringerung von Integrin $\beta 3$. Bei den A-498 Zellen zeigten ebenfalls die Sunitinib-resistenten Zellen eine reduzierte Expression von Integrin $\beta 3$ nach ART-Gabe. Die Expression der parentalen Zellen war nicht verändert.

In guter Übereinstimmung zu den mit ART behandelten Zelllinien 786-O, KTCTL-26 und A-498 der vorliegenden Arbeit, führte die Behandlung mit Artemisinin auch in Melanomzellen zu einer herunterregulierten Integrin $\beta 3$ -Expression, die mit einer reduzierten Migration einherging (291). Eine Beteiligung von Integrin $\beta 3$ wird auch in der Entstehung von Brustkrebs-Knochenmetastasen diskutiert (292).

Zusammengefasst wurden primär die Integrine $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\beta 3$ basal von den NZK-Zellen exprimiert und durch ART moduliert. Die Zelllinien 786-O und KTCTL-26 zeigten hier, wie auch in den vorherigen Versuchen, ein sehr ähnliches Ansprechen auf ART. Dennoch war eine Heterogenität zwischen den Zelllinien zu erkennen und somit eine mögliche

unterschiedliche Funktion der einzelnen Integrine. Welche funktionelle Relevanz die durch ART veränderten Integrine tatsächlich aufweisen, wurde daher in Blockadestudien untersucht.

4.2.9 Die durch ART regulierten Integrine führen zu einer veränderten Adhäsion und Migration (Blockadestudien)

In den vorherigen Versuchen wurde deutlich, dass ART die Adhäsion und Migration von NZK-Zellen signifikant beeinflusst. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ART regulierend auf die Expression von Integrin-Untereinheiten einwirkt. Inwiefern die Regulation der Integrinexpression durch ART dafür verantwortlich ist, sollte mit funktionsblockierenden Antikörpern vertiefend geklärt werden. Da in den vorangegangenen Versuchsreihen überwiegend die Integrine $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\beta 3$ in den NZK-Zellen durch ART verändert wurden, wurde die funktionelle Relevanz dieser vier Integrine mittels Blockadestudien exemplarisch an Caki-1 und 786-O Zellen untersucht.

4.2.9.1 Die Blockade von Integrin-Untereinheiten verändert die Zelladhäsion

Die Behandlung mit ART resultierte in einer signifikant reduzierten Zelladhäsion von parentalen Caki-1 Zellen und Sunitinib-resistenten 786-O Zellen an EZM-Proteine und HUVEC. Für die vertiefenden Integrin-Blockadestudien wurden deshalb diese beiden Subzelllinien herangezogen.

Die Blockade der Integrine $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\beta 3$ führte generell zu einer gesteigerten Adhäsion parentaler Caki-1 Zellen. Lediglich die funktionelle Blockade von Integrin $\beta 1$ resultierte in einer signifikant gesenkten Adhäsion an Kollagen. Da die Integrin-Untereinheit $\beta 1$ auch in der Expression nach ART-Gabe signifikant reduziert vorlag, könnte diese für die durch ART reduzierte Adhäsion an Kollagen mitverantwortlich sein. Zumindest an Urothelkarzinom-(293) und Blasenkrebszellen (293, 294) konnte gezeigt werden, dass eine Integrin $\beta 1$ -Blockade auch zu einer verringerten Adhäsion führt. Die Behandlung der parentalen Caki-1 mit ART mündete demgegenüber in einer signifikant gesteigerten Integrin $\beta 3$ -Expression. Die Blockade andererseits resultierte in keiner oder einer gesteigerten Adhäsion und könnte somit im Umkehrschluss auch die reduzierte Adhäsion durch ART begründen. Obwohl Integrin $\alpha 5$ nach ART-Behandlung reduziert vorlag, ist diese Untereinheit offensichtlich nicht an der verminderten Adhäsion parentaler Caki-1 Zellen beteiligt, wie die funktionelle Blockade von Integrin $\alpha 5$ zeigte. Dies stimmt gut mit den Ergebnissen einer andere Arbeit an Caki-1 Zellen überein (276).

Sunitinib-resistente 786-O Zellen reagierten auf die Blockade von Integrin $\alpha 3$ mit einer gesteigerten Adhäsion an Plastik, Kollagen und HUVEC. Eine ART-Behandlung resultierte

umgekehrt in einer signifikanten Erhöhung von Integrin $\alpha 3$ und gleichzeitig reduzierten Adhäsion. Die Blockade konnte somit bestätigen, dass die Abnahme der Adhäsion durch ART auf die gesteigerte Expression von Integrin $\alpha 3$ zurückzuführen ist. Weiterhin führte die Blockade von Integrin $\alpha 5$, anders als nach ART-Gabe, zu einer reduzierten Adhäsion der Tumorzellen, mit Ausnahme der Adhäsion an HUVEC. Integrin $\alpha 5$ ist hier also offensichtlich nicht in die Adhäsion involviert. Die Blockade von Integrin $\beta 1$ steigerte die Adhäsion an Plastik und HUVEC und reduzierte adhärenzte Zellen auf einer Kollagenbeschichtung. Die verringerte Adhäsion an Kollagen nach Integrin $\beta 1$ -Blockade passt gut zu einer Studie an Prostatakarzinomzellen (295). Dort resultierte der funktionelle Verlust von Integrin $\beta 1$ ebenfalls in einer gesenkten Anheftung an Kollagen. Jedoch lag das Protein in der vorliegenden Arbeit in Sunitinib-resistenten 786-O Zellen nach einer ART-Behandlung in der Oberflächenexpression erhöht vor. Möglicherweise verhindert ART hier die Funktion des Transmembranproteins und die Signaltransduktion in die Zelle. Eine Studie an Magenkrebszellen stellte heraus, dass die Gabe von ART in einer Akkumulation von innerzellulärem Calcium resultiert, mit einhergehender Onkose (296). Ältere Studien konnten klar herausstellen, dass Calcium einen physiologischen Regulator der Integrin-vermittelten Zelladhäsion darstellt (297).

Ein Zusammenhang zwischen einer Integrin-Regulation und einer verminderten Adhäsion durch ART konnte somit zelltypspezifisch für Integrin $\beta 1$ und $\beta 3$ in Caki-1 Zellen und für Integrin $\alpha 3$ und $\beta 1$ in 786-O Zellen nachgewiesen werden.

4.2.9.2 Die Blockade von Integrin-Untereinheiten verändert die Zellmigration und Chemotaxis

Die Blockade der Integrin-Untereinheiten $\alpha 3$ und $\beta 3$ konnte in Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen die Migration und Chemotaxis signifikant reduzieren. Die funktionelle Blockade von Integrin $\alpha 5$ und $\beta 1$ führte hingegen zu keiner Veränderung der Zellmigration parentaler und Sunitinib resistenter Caki-1 Zellen. Parentale Caki-1 Zellen sprachen nicht auf die Blockade von Integrin $\alpha 3$ und $\beta 3$ an. Auch in den Migrationsstudien (Migration und Wundheilungstest) zeigten lediglich die Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen eine verminderte Migration nach ART-Gabe. $\alpha 3$ und $\beta 3$ lagen jedoch unverändert oder höher exprimiert nach einer ART-Behandlung vor, so dass eine Beteiligung der beiden Integrin-Untereinheiten an der verringerten Migration durch ART nicht klar herausgestellt werden konnte.

In parentalen und Sunitinib-resistenten 786-O Zellen führte die Blockade von Integrin $\alpha 3$ und $\beta 3$ zu einer signifikant verminderten Migration und Chemotaxis. Dies korreliert sehr gut mit den Ergebnissen nach einer ART-Behandlung. So reduzierte die ART-Gabe die Integrin-Untereinheit $\beta 3$ bei parentalen und Sunitinib-resistenten 786-O Zellen signifikant. Auch im

Wundheilungstest mündete die Gabe von ART in einer verringerten Zellmigration von parentalen und Sunitinib-resistenten 786-O Zellen. Die Integrin-Untereinheit $\beta 3$ könnte daher ein Schlüsselement in der durch ART reduzierten Migration von 786-O Zellen darstellen. Auch eine frühere Studie an KTCTL-26 Zellen konnte belegen, dass die Integrin $\beta 3$ -Inhibition in einer verminderten Chemotaxis mündet (278). KTCTL-26 Zellen sind den 786-O Zellen charakteristisch sehr ähnlich und repräsentieren einen Primärtumor (*Primarius*) der Niere. So führte die Behandlung mit ART auch bei beiden Zelllinien, 786-O und KTCTL-26, zu einer verringerten Expression von Integrin $\beta 3$. Die funktionelle Inhibition von Integrin $\beta 1$ zeigte hingegen keine Veränderungen in der Motilität der Zellen. Das Protein lag jedoch nach der ART-Gabe signifikant erhöht in Sunitinib-resistenten 786-O Zellen vor. Die Zellen reagierten dazu sensitiv auf ART mit einer verringerten Migration im Wundheilungstest. In einer Studie an Rhabdomyosarkomzellen führte die ART-Behandlung zu einer erhöhten Expression von Integrin $\beta 1$, die auch hier mit einer verringerten Migration im Wundheilungstest einherging (289). Offensichtlich hängt dies aber nicht direkt zusammen, wie die Blockadestudien der hiesigen Arbeit zeigen konnten.

4.3 SHI zeigt eine antitumorale Wirkung in parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen

4.3.1 SHI reduziert das Wachstum von parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen

Die SHI-Behandlung zeigte eine dosisabhängige Wachstumsinhibition aller getesteten NZK-Zelllinien. Durch eine längere Inkubationszeit konnte eine potenzierende Wirkung beobachtet werden. Die initiale Wirkung trat jedoch bereits nach 24 bzw. 48 h ein. Die Zelllinien Caki-1, 786-O und KTCTL-26, die histopathologisch als klarzellige NZK definiert sind, reagierten am sensitivsten auf die SHI-Gabe. Die Zelllinie A-498 reagierte mit einer signifikanten Reduktion des Zellwachstums (Viabilität), jedoch insgesamt mit einer geringeren Sensitivität im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien (IC_{50} : 1,2 – 1,9 μM). Am stärksten sprach die Zelllinie Caki-1 auf SHI an. Der IC_{50} schwankte zwischen 0,5 und 1,5 μM , wobei in den Sunitinib-resistenten Caki-1, 786-O und A-498 Zellen tendenziell eine geringere Sensitivität gegenüber den parentalen Subtypen zu verzeichnen war. Die Wachstumsinhibition durch SHI in den klarzelligen NZK-Zelllinien Caki-1, 786-O und KTCTL-26 könnte auf eine Inaktivierung des EGFR zurückzuführen sein. In Glioblastomazellen reduzierte SHI das Wachstum durch Hemmung des EGFR (298). Außerdem ist SHI als spezifischer PKM2-Inhibitor bekannt, ein Enzym, das nur in fötalem und Tumorgewebe exprimiert wird (174). Eine Hemmung der PKM2 durch SHI würde die metabolische Aktivität und damit das Wachstum der Zellen inhibieren. Für das NZK konnte bereits gezeigt werden, dass ein

Zusammenhang zwischen einer gesteigerten PKM2-Expression und der Aggressivität des Tumors besteht (176). In der Literatur finden sich keine Daten zu SHI beim NZK. Studien anderer urologischer Tumorentitäten definierten eine Arbeitskonzentration mit sehr sensitivem Ansprechen von 0,4 μM beim Harnblasen- (205) und eine Spanne von 0,5 – 10 μM beim Prostatakarzinom über einen Zeitraum von 24 h (166). An Prostatakarzinomzellen konnte zudem gezeigt werden, dass auch therapieresistente Zellen mit einem signifikant reduzierten Zellwachstum auf eine SHI-Gabe reagierten (299). Aber auch Publikationen zu nicht urologischen Tumoren, wie dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom konnten *in vitro* ab 2 μM SHI eine 100 %ige Inhibition der Zellviabilität nachweisen (300). Höhere Dosierungen sind jedoch bei anderen Tumorentitäten nicht unüblich. Der Dosis-Wirkungsbereich variiert somit entitätspezifisch. Bei weniger SHI-sensitiven Tumorentitäten, wie dem Ovarialkarzinom, wurden Konzentrationen bis über 100 μM eingesetzt, mit einem IC_{50} von ca. 10 μM (301). Das NZK kann somit, im Vergleich mit der Literatur zu anderen Tumoren, eher als SHI-sensitiver Tumor bezeichnet werden. Diskutiert wird zudem die Rolle von SHI als potenter VEGFR-2-Inhibitor (302, 303), ein Rezeptor der auch durch Sunitinib gehemmt wird. In *in vivo*-Studien könnte SHI somit das Zellwachstum, auch durch Hemmung der Angiogenese, weiter reduzieren. Weiterführende Untersuchungen sind notwendig um dies zu evaluieren.

4.3.2 SHI reduziert die Proliferation von parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen

SHI reduzierte weiterhin signifikant die Proliferation der getesteten NZK-Zellen. Diese fiel zwar geringer aus als die Wachstumsinhibition, folgte insgesamt aber dem zuvor beobachteten dosisabhängigen Verlauf. Auch bei Zellen des Prostatakarzinoms führte die SHI-Gabe zu einer reduzierten Proliferation, die dosisabhängig war (299). In einer Studie mit Gliomzellen wurde ebenfalls eine dosisabhängige Inhibition der Proliferation durch SHI deutlich (304). Ein hemmender Effekt von SHI auf die Proliferation konnte auch beim Brustkrebs für die Zelllinie MCF-7 gezeigt werden (305). In dieser Studie ging die SHI-Gabe mit einer zeit- und dosisabhängigen Proliferationsinhibition über 72 h einher. Auch hier war bereits nach 24 h SHI-Behandlung mit 5 μM eine Inhibition der Proliferation von mehr als 50 % zu verzeichnen (305). Das Wachstum der SHI-behandelten MCF-7 Zellen wurde ebenfalls stärker als die Proliferation gehemmt, wie eine andere Studie zeigte (209). Nach einer Inkubation mit 5 μM SHI über 48 h wurde in den beiden Studien eine Wachstumshemmung von ca. 93 % gemessen, die Proliferation war hingegen um ca. 70 % inhibiert. Auch in der vorliegenden Studie waren die Effekte auf Wachstum und Proliferation durch SHI, wie erwähnt, unterschiedlich stark ausgeprägt. Eine stärkere Hemmung des Wachstums im Vergleich zur Proliferation ist für SHI also bereits bekannt. Die Diskrepanz

zwischen Wachstum und Proliferation könnte in einer stärkeren Wirkung von SHI auf den Metabolismus begründet sein. Eine Studie, die den Einfluss von SHI auf unterschiedliche Darm- und Brustkrebszelllinien untersuchte, konnte zeigen, dass die Behandlung zu einem ROS-Anstieg und dem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotenzials führte (167). MTT, das die Grundlage des Zellwachstumstests darstellt und im aeroben, mitochondriengebundenen Metabolismus verstoffwechselt wird, könnte daher einen viel stärkeren Effekt der SHI-Behandlung aufzeigen (306). Erst durch die Messung des Zellwachstums (bzw. der Zellviabilität) und der Proliferation (307), wie hier geschehen, kann somit eine valide Aussage über den inhibitorischen Effekt eines Stoffes auf das Wachstumsverhalten getroffen werden.

4.3.3 SHI hemmt das klonogene Wachstum von parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen

Im Rahmen von klonogenen Wachstumsanalysen sollten zusätzlich Langzeiteffekte von SHI auf das Wachstumsverhalten und das Metastasierungspotenzial untersucht werden. Die Wachstumsstudien mit kurzzeitiger SHI-Behandlung (24 – 72 h) zeigten, dass das Wirkspektrum von SHI im einstelligen mikromolaren Bereich bzw. im Falle der Zelllinie Caki-1 im dreistelligen nanomolaren Bereich liegt. Im klonogenen Wachstum nach 10-tägiger Inkubation zeigte SHI jedoch bereits im nanomolaren Bereich eine starke und signifikante inhibitorische Wirkung auf alle NZK-Zelllinien. Unterschiede zwischen parentalen und Sunitinib-resistenten Zellen waren gering. Eine signifikante Reduktion der Zellkolonien konnte ab 200 nM SHI ermittelt werden, für A-498 Zellen als insensitivste Zellen ab 300 nM SHI. Im Vergleich zu den Wachstumsanalysen reagierten die A-498 Zellen im klonogenen Wachstumstest jedoch insgesamt mit einer etwa 5-fach höheren Empfindlichkeit gegenüber SHI. Ähnliche Effekte von SHI konnten in anderen Tumorentitäten gezeigt werden. Bei Tumorzellen der Gallenblase konnte nach der Behandlung mit SHI ein analoges Bild zu den hier am NZK erhobenen Daten bezüglich des Ansprechens gezeigt werden (208). Auch dort sprachen die Zellen sensitiver im klonogenen Wachstumstest als im Zellwachstum an. Die Behandlung von Retinoblastomzellen (308) und Zellen des kolorektalen Karzinoms mit SHI (210, 309, 310) resultierte ebenfalls in einer verringerten Bildung von Zellkolonien. SHI vermag somit längerfristig signifikante antitumorale Effekte zu induzieren, die auch in initial weniger sensitiven Zellen vergleichsweise stark ausfallen können. Insgesamt sind dabei in der Langzeitbehandlung geringere SHI-Konzentrationen notwendig. Weiterhin konnte der klonogene Wachstumstest zeigen, dass neben dem Wachstum auch das Potenzial einzelner Tumorzellen, sich neu anzusiedeln, durch SHI signifikant inhibiert wird.

4.3.4 Die Behandlung mit SHI führt zelltypspezifisch zu einem G2/M-Zellzyklusarrest

Die Hemmung der Wachstumseigenschaften der NZK-Zellen unter Behandlung mit SHI gingen zelltypspezifisch mit einem G2/M-Phase-Arrest in den 786-O, KTCTL-26, parentalen A-498 und Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen einher. Die Sunitinib-resistenten A-498 Zellen zeigten lediglich einen tendenziellen Anstieg in der G2/M-Phase, parentale Caki-1 Zellen hingegen einen Anstieg in der G0/G1-Phase. In einer Studie an Brustkrebszelllinien führte die Behandlung mit SHI zu einem signifikanten Anstieg der Zellen in der G2/M-Phase (311). Auch führte die Behandlung mit SHI bei Prostatakarzinomzellen zu einem G2/M-Phase-Arrest (150), der auch in therapieresistenten DU145 Prostatakarzinomzellen beobachtet werden konnte (299). Ein Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase nach SHI-Gabe wurde auch bei Tumorzellen der Gallenblase beschrieben, der mit intrinsischen apoptotischen Effekten einherging (208). Ein dosisabhängiger Effekt wurde bei Darmkrebszelllinien deutlich (210). Mit steigender SHI-Konzentration nahm dabei die Anzahl der Zellen in der G0/G1-Phase signifikant zu (210).

Auf molekularer Ebene reduzierte die SHI-Behandlung signifikant die Expression von Cyclin B, CDK1 und pCDK1 bei parentalen und Sunitinib-resistenten Caki-1 Zellen. In den 786-O Zellen führte die SHI-Gabe zu einer verringerten Expression von Cyclin A und CDK1 und nur bei dem resistenten Pendant zu einer geringeren Cyclin B-Expression. Wie bereits beschrieben, setzt sich der *Mitosis-promoting Factor* (MPF) aus Cyclin B im Komplex mit CDK1 zusammen, der den Übergang von der G2-Phase hin zur Mitose einleitet (239). CDK1 ist dabei konstitutiv vorhanden, die Cyclin B-Expression steigt ab der S-Phase an und fällt nach der Mitose wieder ab (239). Der Komplex ist nicht nur ein Initiator der Mitose, sondern ebenfalls involviert in die Bildung des Spindelapparates (312). Ein herunterreguliertes Cyclin B könnte somit den Übergang von der G2-Phase hin zur Mitose unterbinden und bei den mit SHI behandelten NZK-Zellen zum Zellzyklusarrest führen. Analysen an hepatozellulären Karzinomzellen stellten heraus, dass eine negative Regulation von Cyclin B und CDK1 ebenfalls zu einem Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase führt (313). Des Weiteren wurde eine tendenzielle Zunahme von p21 bei resistenten Caki-1 und 786-O Zellen messbar. Eine Studie, die unterschiedliche Tumorzelllinien heranzog, zeigte, dass die Behandlung mit SHI über 24 h zu einem p21 Anstieg führen kann, der wiederum in einem G2/M-Zellzyklusarrest mit darauffolgender Apoptoseinduktion mündet (314). Abweichend dazu konnte bei parentalen Caki-1 Zellen, welche nach der SHI-Gabe in der G0/G1-Phase arretierten, eine in der Tendenz erhöhte Expression von p27 detektiert werden. SHI induzierte bereits einen Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase bei Plattenepithelkarzinomzellen, der mit einem signifikanten Anstieg der Proteinexpression von

p27 einherging (315). Zumindest bei Zellen des hepatozellulären Karzinoms konnte gezeigt werden, dass eine p27-Überexpression zu einem Arrest in der G1-Phase führt (316). In guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der parentalen Caki-1 Zellen in der vorliegenden Arbeit, arretierten die Zellen in einem Zellkulturmodell mit immortalisierten Keratinozyten nach einer SHI-Behandlung ebenfalls in der G0/G1-Phase (317). Hier war, wie bei den Caki-1 Zellen, das Protein Cyclin B reduziert und die Behandlung der Keratinozyten mit SHI mündete in einer Apoptoseinduktion.

Insgesamt konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass die Behandlung mit SHI über die Modulation zellzyklusregulierender Proteine in einem Zellzyklusarrest in der G0/G1 oder G2/M-Phase resultieren kann.

4.3.5 SHI induziert apoptotische Effekte

Im Weiteren sollte herausgestellt werden, inwiefern der stark wachstumshemmende Einfluss von SHI auf NZK-Zellen auf apoptotische Prozesse zurückzuführen ist. Nach einer Behandlung mit SHI [1,5 µM] über 48 h stieg die Anzahl apoptotischer Zellen in allen NZK-Zelllinien signifikant an. KTCTL-26 Zellen zeigten die höchste Sensitivität auf SHI mit einer 3- bis 4-fachen Steigerung. Dies deutet darauf hin, dass die bereits im Proliferationstest beobachtete hohe Sensitivität der KTCTL-26 Zellen insbesondere durch apoptotische Ereignisse begründet ist. Eine Ausnahme bildete die Zelllinie A-498, mit einem nicht signifikanten Zuwachs apoptotischer Zellen. Der zuvor detektierte G2/M-Zellzyklusarrest spiegelt somit recht gut die Apoptoseinduktion wider. Die initial gestoppte Mitose mündet im Zelltod (318).

In der Literatur wird mehrfach beschrieben, dass SHI die Apoptose auslösen kann (137). Bei Darmkrebszelllinien führte die SHI-Gabe dazu, dass die Apoptose induziert wird (319). Auch beim Pankreaskarzinom vermochte SHI *in vitro* die Apoptose zu induzieren (177). Zudem konnten apoptotische Effekte bei Tumorzelllinien des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms nach SHI-Gabe nachgewiesen werden (320). Weiterhin konnte bei Brustkrebszelllinien die Inhibition der Proliferation auf apoptotische Prozesse zurückgeführt werden (321). Eine Studie an Magenkrebszelllinien wies nach, dass der apoptotische Effekt von SHI über Caspase 3- und JNK-abhängige Wege sowie über den p53-Nrf2 vermittelten Signalweg induziert wurde (322). Bei Darmkrebszellen resultierte die Gabe von SHI in einem Anstieg von ROS, der seinerseits die intrinsische Apoptose induzierte (210). Ein Anstieg von ROS kann jedoch auch direkt oder indirekt nekroptotische Effekte herbeiführen, an denen p53 beteiligt sein kann (323). ROS-induzierte DNA-Schäden sind dafür maßgeblich mitverantwortlich (323).

Interessanterweise ging die Apoptose in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht mit der erwartenden erhöhten Expression der Caspasen 3 und 8 in den NZK-Zellen einher. Im Gegenteil wurde die Caspase 3 sogar gehemmt, was die Frage aufwarf, ob es sich hier tatsächlich um eine Apoptose handelt, die durch SHI induziert wird.

4.3.6 SHI induziert die Nekroptose

Hinweise aus der Literatur deuten darauf hin, dass die Annexin V-Bindung, die für den Apoptosenachweis Verwendung findet, auch ein Marker für die Nekroptose, einen weiteren regulierten Zelltod, sein kann (324). Verschiedene *in vitro*-Studien belegen, dass SHI die Nekroptose induzieren kann (177, 300). Die Nekroptose, ein Caspase-unabhängiger Zelltod, wird insbesondere durch die Nekrosomkomplexproteine RIP1, RIP3 und MLKL reguliert (180). Tatsächlich konnte SHI in allen parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen signifikant die Nekroptose induzieren. So wurde die Wachstumsinhibition durch SHI in der Kombinationsbehandlung mit Necrostatin-1, einem RIP1-Inhibitor, aufgehoben. Die Effekte traten dabei bereits schon nach 24 h Behandlung auf. Hier konnte durch den Nekroptose-Inhibitor die SHI-Wirkung vollständig aufgehoben werden. Die beobachtete Wachstumsinhibition nach SHI-Gabe wirkt somit offensichtlich vorwiegend über nekroptotische Ereignisse. Die Nekroptose-Induktion ging dabei mit einer signifikanten Erhöhung der Expression und Aktivität des Nekrosomkomplexproteins RIP1 einher. Besonders der detektierten Phosphorylierung an Serin 166 wird eine entscheidende Rolle in der Nekrosombildung des Nekroptose-Signalwegs zugesprochen (325). Dies konnte auch in einer Studie an Prostatakarzinomzellen gezeigt werden (299). Dort ließ sich, wie bei den erhobenen Daten zum NZK, eine signifikante Erhöhung von pRIP1 (Ser166) detektieren und der wachstumshemmende Effekt von SHI durch Necrostatin-1 aufheben. Auch in einer Arbeit am Pankreaskarzinom vermochte SHI die RIP1-assoziierte Nekroptose zu induzieren (177). Nachgewiesen werden konnte dies unter Verwendung spezifischer Inhibitoren. So wurde die Apoptose mit z-VAD, einen multi-Caspase-Inhibitor, und die Nekroptose mit Necrostatin-1, einen RIP1-Inhibitor, blockiert. Beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom konnte SHI ebenfalls die Nekroptose herbeiführen (300). Auch hier war gleichzeitig ein Anstieg von RIP1 zu beobachten. In Osteosarkom-Zelllinien führte die Gabe von SHI ebenfalls zu einem Anstieg nekroptotischer Ereignisse, die mit einer erhöhten Expression von RIP1 und RIP3 korrelierten (326). Weiterhin konnte SHI in Harnblasenkarzinomzellen die Nekroptose induzieren, was mit einem Anstieg von RIP3 und pRIP3 einherging (205).

Interessanterweise zeigten alle NZK-Zelllinien ein gesteigertes Wachstum bei der alleinigen Gabe von Necrostatin-1, was verdeutlicht, dass auch ohne SHI-Behandlung die Nekroptose in NZK-Zellen, zumindest im kleinen Rahmen, eine Rolle spielt. Dies konnte ebenfalls in Patientenstudien auf Basis von Tumorbiopsien klarzelliger tubulärer Epithelzellen der Niere

im UICC Stadium I gezeigt werden (327). Hier fand sich im Vergleich zu gesundem Gewebe eine erhöhte Expression der Nekroptose-induzierenden Proteine RIP1 und RIP3 (327). Die Autoren postulierten, dass die erhöhte Expression das Gewebe für eine TNF-vermittelte Nekroptose sensitiviert und daher einen Angriffspunkt für zielgerichtete Therapieoptionen bietet (327). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die TNF-vermittelte Nekroptose die RIP1/RIP3/MLKL-Achse aktiviert (327). Die grundsätzliche Fähigkeit der NZK-Zellen zur Nekroptose könnte das sensitive Ansprechen auf SHI begründen. Auch wenn das klarzellige NZK häufig mit einem defekten oder mutierten VHL-Status assoziiert ist, konnte hier bei allen NZK-Zelllinien, unabhängig vom VHL-Mutationsstatus, eine SHI-induzierte Nekroptose identifiziert werden.

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit zeigen, dass SHI in den parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen eine signifikante Wachstumshemmung induziert. Diese ist insbesondere auf einen Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase und eine Nekroptose-Induktion zurückzuführen.

4.3.7 SHI beeinflusst das Integrin-Expressionsmuster, jedoch nicht die Adhäsion und Migration von parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen

Einen weiteren wichtigen Aspekt im Tumorprogress stellt neben dem Wachstumsverhalten das Metastasierungsverhalten von Tumorzellen dar. Entgegen der Messungen mit ART führte die Gabe von SHI nicht zu einer Veränderung der Adhäsion bei den NZK-Zellen, hier exemplarisch an Caki-1 und 786-O. Auch die Migration und Chemotaxis wurde in den Caki-1 Zellen durch SHI nicht weiter beeinflusst. Die Migration und Chemotaxis der 786-O Zellen wurde hingegen nach SHI-Behandlung sogar erhöht. Aufgrund des signifikant verminderten klonogenen Wachstums durch SHI, Indikator für das Potenzial der Einzelzellen, sich neu anzusiedeln und zu vermehren, sollte die erhöhte Migration und chemotaktische Aktivität der 786-O trotzdem keine effektive Metastasierung erlauben. Das unterschiedliche Ansprechen der beiden Zelllinien, vor allem hinsichtlich der Migration, könnte auf die Expression der Integrin-Untereinheiten $\alpha 2$ und $\beta 1$ zurückzuführen sein. Die Untereinheiten lagen bei der Zelllinie 786-O stärker exprimiert, bei der Zelllinie Caki-1 hingegen nicht verändert oder reduziert vor. Die mit Kollagen beschichtete Wachstumsfläche im Migrationsmodell könnte in der vorliegenden Studie für die gesteigerte Motilität mitverantwortlich sein, da Integrin $\alpha 2\beta 1$ den zugehörigen Liganden darstellt (328). Die höhere Expression der Integrine könnte somit das gesteigerte Migrationspotenzial von 786-O Zellen nach einer SHI-Behandlung erklären. Auch Integrin $\beta 3$ in den parentalen 786-O Zellen könnte in die stärkere Migration involviert sein, wie die Blockadestudien zeigen. Weiterhin weisen die Blockadestudien darauf hin, dass

Integrin $\alpha 3$ und $\beta 1$ in den Sunitinib-resistenten Zellen und Integrin $\beta 3$ in den parentalen 786-O Zellen für die erhöhte chemotaktische Aktivität mitverantwortlich sein könnten.

Die Integrin-Regulation durch SHI zeigte wenig Einfluss auf die Adhäsion und Migration von NZK-Zellen gezeigt. Da Integrine als Transmembranproteine auch in die Signalkaskaden für das Zellüberleben und Zellwachstum involviert sind (274), könnten diese somit auch an der starken wachstumsinhibierenden Wirkung von SHI beteiligt sein. Weitere Untersuchungen müssen dies klären.

5 Fazit

Mit der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig grundlegend das Wirkspektrum von ART und SHI bei parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen beschrieben werden. Beide Stoffe induzierten heterogene antitumorale Effekte. Dazu zählten insbesondere eine zeit- und dosisabhängige Inhibition des Zellwachstums und der Proliferation, aber auch des klonogenen Wachstums. Diese Effekte basierten bei ART insbesondere auf der Induktion eines Zellzyklusarrests in der G0/G1-Phase und auf ferroptotischen Ereignissen. Weiterhin konnte ART signifikant die Metastasierungseigenschaften der parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen hemmen. Die Wachstumshemmung durch SHI war hingegen mit der Induktion der Apoptose bzw. der Nekroptose und partiell eines Zellzyklusarrests in der G2/M-Phase assoziiert. Entsprechende regulatorische Proteine wurden jeweils moduliert. Weiterführende Analysen sind notwendig, um die gewonnenen Daten zu verifizieren.

6 Ausblick

Neben den Wachstums- und Metastasierungshemmenden Einflüssen von ART und SHI konnte gezeigt werden, dass beide Stoffe offensichtlich eine Wirkung auf den Zellmetabolismus haben. So ist auch in der Literatur beschrieben, dass ART die Mitochondrien beeinflusst und SHI PKM2 inhibiert, also die Glykolyse bremst. Methodisch ist eine Überprüfung dieser Effekte mit einem „Seahorse“ möglich, einem Lebendzell-Metabolismus Analysator, der in der Arbeitsgruppe neu zur Verfügung steht. Entsprechende Messungen sollen das Projekt in der Zukunft weiter sinnvoll ergänzen. Durch das klonogene Wachstum konnte veranschaulicht werden, dass SHI bereits in geringen nanomolaren Dosen signifikante antitumorale Effekte induziert. Längere Inkubationszeiten mit geringen Dosen könnten das Wirkspektrum somit erweitern. Untersuchungen zur Nekroptose könnten gerade auch in diesem Setting weiter vertieft werden und neue Aufschlüsse über die Wirkmechanismen von SHI liefern, so die Evaluation der Expression und Aktivität weiterer Nekrosomkomplexproteine, wie RIP3 und MLKL. Da ROS auch bei der Nekroptose eine entscheidende Rolle einnehmen kann, wären Messungen von ROS auch nach der

Behandlung mit SHI interessant. SHI konnte die Expression von Integrinen verändern, jedoch keine positiven Effekte in Bezug auf die Metastasierung erzielen. Denkbar ist, dass die durch SHI regulierten Integrin-Untereinheiten stattdessen in das Zellwachstum involviert sind. Auch dies könnte im Folgenden durch entsprechende Blockadestudien näher untersucht werden. Hervorzuheben bleibt, dass die antitumoralen Effekte von ART und SHI nicht nur in parentalen, sondern auch in Sunitinib-resistenten NZK-Zellen gemessen werden konnten. Dies zeigt, dass die Resistenzmechanismen gegenüber dem TKI Sunitinib offensichtlich nicht das Wirkspektrum dieser beiden Stoffe beeinflussen. Interessant wäre es daher auch festzustellen, inwiefern sich eine Sunitinib-Resistenzentstehung durch eine direkte kombinierte Gabe mit ART oder SHI bei chronischer Behandlung eventuell direkt vermeiden lässt. Die vorliegende Arbeit konnte erfolgreich erstmalig grundlegend Einblicke in die Wirkmechanismen von ART und SHI im Sunitinib-resistenten NZK bieten. Proteomische Analysen könnten das Projekt weiter sinnvoll ergänzen, um vertiefend weitere Wirkmechanismen der Stoffe zu identifizieren. Zusätzliche Studien, die eruieren, inwiefern ART und SHI auch die Therapie mit weiteren bereits zugelassenen Standard-Therapeutika bereichern können, wären ebenfalls interessant.

Final ist anzustreben, dass die *in vitro*-Ergebnisse *in vivo* auf einen Organismus (Maus) übertragen werden, um dem translationalen Anspruch dieser Arbeit gerecht zu werden und längerfristig die Etablierung eines neuen innovativen Therapiekonzeptes für Patienten mit fortgeschrittenem NZK zu ermöglichen.

7 Zusammenfassung

Fortschritte in der Behandlung des Nierenzellkarzinoms (NZK) resultierten in den letzten Dekaden in einem verlängerten Überleben. Zielgerichtete Therapien, wie der Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI), sind dafür mitverantwortlich. In der Erstlinientherapie kommt häufig Sunitinib, ein TKI, zur Anwendung. Trotz zuerst gutem Ansprechen ist die Wirkung auf Grund entstehender Resistenzen zeitlich limitiert. Neue wirkungsvollere Behandlungsoptionen werden somit weiterhin dringend gesucht. Artesunat (ART) und Shikonin (SHI) aus der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) könnten hier neue Therapieoptionen darstellen. Beide Substanzen haben bereits eine antitumorale Wirkung gezeigt. Daten zum fortgeschrittenen oder gar therapieresistenten NZK lagen bisher nicht vor. Daher wurden erstmalig an therapiesensitiven und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen ART und SHI auf ihre antitumorale Aktivität hin untersucht. Zur Resistenzinduktion wurden die NZK-Zellen Caki-1, 786-O, KTCTL-26 und A-498 chronisch mit Sunitinib [1 μM] behandelt. Unbehandelte parentale Zellen dienten als Kontrollen. Dosis-Wirkungskurven von ART [1 – 100 μM] und SHI [0,5 – 2,5 μM] wurden mittels MTT-Test erstellt. Weiterhin wurden die Proliferation (BrdU), das klonogene Wachstum, die Verteilung in den Zellzyklusphasen und die Apoptose sowie mittels Western-Blot die zugrundeliegenden molekularen Modulationen nach mit ART [10 – 50 μM] und SHI [0,5 – 2,5 μM] Behandlung untersucht. Weiterhin wurden der Einfluss von ART auf die Ferroptose und von SHI auf die Nekroptose, zwei weitere regulierte Zelltode, evaluiert. Um den Effekt von ART bzw. SHI auch auf das Metastasierungsverhalten zu eruieren, wurden die Adhäsion, Migration und Chemotaxis nach einer Behandlung mit ART und SHI sowie die Expression von Adhäsionsrezeptoren (Integrine) untersucht. ART und SHI induzierten zeit- und dosisabhängig eine signifikante Reduktion des Tumorzellwachstums und der Proliferation in parentalen und Sunitinib-resistenten NZK-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Dies ging in den ART-behandelten NZK-Zellen insbesondere mit einem Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase und in den SHI-behandelten Zellen mit einem G2/M-Phase-Arrest einher. Die Veränderungen im Zellzyklus waren dabei mit distinkten Modulationen der zellzyklusregulierenden Proteine assoziiert. Beide Stoffe konnten zudem zelltypspezifisch apoptotische Effekte induzieren. In SHI-behandelten NZK-Zellen war dies hauptsächlich auf nekroptotische Ereignisse zurückzuführen. In guter Übereinstimmung wurde unter SHI parallel die Expression und Aktivität des Nekrosomkomplexproteins RIP1 erhöht. ART konnte hingegen zusätzlich zur Apoptose zelltypspezifisch die Ferroptose, eine Eisen-induzierte Form des geregelten Zelltods, induzieren. Neben den Wachstumseigenschaften wurde in ART-behandelten NZK-Zellen weiterhin das Metastasierungsverhalten gehemmt. SHI-behandelte Zellen zeigten keinen solchen Effekt und wiesen zum Teil eher eine Steigerung der Motilität auf. Jedoch wurde gleichzeitig durch SHI das klonogene Wachstum,

Indikator für das Ansiedeln und Wachstum von Einzelzellen, signifikant inhibiert, was insgesamt dennoch für eine Hemmung der Metastasierung spricht.

Die ART- und SHI-Behandlung resultiert sowohl in parentalen als auch in therapieresistenten NZK-Zellen in distinkten antitumoralen Effekten. Beide Stoffe könnten somit eine potentielle Begleittherapie für Patienten mit fortgeschrittenem NZK darstellen. Weiterführende Untersuchungen sollen dies verifizieren.

8 Summary

Advances in the treatment of renal cell carcinoma (RCC) have resulted in prolonged survival in recent decades. Targeted therapies, such as tyrosine kinase inhibitors (TKI), are partly responsible for this. Sunitinib, a TKI, is often used in first-line therapy. Despite an initial good response, the effect is limited in time due to emerging resistance. New more effective treatment options are therefore still urgently sought. Artesunate (ART) and shikonin (SHI) from Traditional Chinese Medicine (TCM) could represent new therapeutic options. Both substances have already shown antitumor activity. Data on advanced or even therapy-resistant RCC were not available. Therefore, for the first time, ART and SHI were investigated in therapy-sensitive and sunitinib-resistant RCC cells for their antitumor activity. For resistance induction, RCC cells Caki-1, 786-O, KTCTL-26 and A-498 were chronically treated with sunitinib [1 μ M]. Untreated parental cells served as controls. Dose-response curves of ART [1 – 100 μ M] and SHI [0.5 – 2.5 μ M] were generated by MTT assay. Furthermore, ART [10 – 50 μ M] and SHI [0.5 – 2.5 μ M] were used to investigate proliferation (BrdU), clonogenic growth, distribution in cell cycle phases and apoptosis. The underlying molecular modulations of the cell cycle phases and apoptosis were examined by Western blot. Moreover, the effect of ART on ferroptosis and SHI on necroptosis, two other regulated cell deaths, were evaluated. To also elicit the effect of ART or SHI on metastatic behavior, adhesion, migration, chemotaxis, as well as adhesion receptor (integrin) expression after treatment with ART and SHI, were examined. ART and SHI induced a significant reduction in tumor cell growth and proliferation in parental and sunitinib-resistant RCC cells in a time- and dose-dependent manner, compared with untreated controls. In particular, this was associated with cell cycle arrest in G0/G1 phase in ART-treated RCC cells and G2/M phase arrest in SHI-treated cells. The cell cycle changes were associated with distinct modulations of cell cycle regulatory proteins. Both substances were also able to induce apoptotic effects in a cell type-specific manner. In SHI-treated RCC cells, the apoptotic effects were mainly caused by necroptotic events. In good agreement with this, SHI increased the expression and activity of the necrosome complex protein RIP1. In contrast, ART was able not only to induce apoptosis but also ferroptosis, an iron-induced form of regulated cell death, in a cell type-specific manner. In addition to growth characteristics, metastatic behavior was also inhibited in ART-treated RCC cells. SHI-treated cells showed no such effect and in some cases even revealed an increase in motility. However, SHI significantly inhibited clonogenic growth, an indicator of single-cell settlement and growth, which overall suggests the inhibition of metastasis. ART and SHI treatment results in distinct antitumor effects in both parental and resistant RCC cells. Thus, both agents may represent a potential adjunctive therapy for patients with advanced RCC. Further studies should verify this.

9 Literaturverzeichnis

1. Fornara P, Hoda MR. [Renal cell carcinoma]. *Urologe A*. 2011;50 Suppl 1:219-22.
2. Goebell PJ, Ivanyi P, Bedke J, Bergmann L, Berthold D, Boegemann M, et al. Consensus paper: current state of first- and second-line therapy in advanced clear-cell renal cell carcinoma. *Future Oncol*. 2020;16(29):2307-28.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018;68(1):7-30.
4. Krebs in Deutschland für 2015/2016. Robert Koch-Institut (Hrsg), Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland eV (Hrsg) 2019;12.
5. Carlo MI, Hakimi AA, Stewart GD, Bratslavsky G, Brugarolas J, Chen YB, et al. Familial Kidney Cancer: Implications of New Syndromes and Molecular Insights. *Eur Urol*. 2019;76(6):754-64.
6. Ljungberg B, Cowan NC, Hanbury DC, Hora M, Kuczyk MA, Merseburger AS, et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update. *Eur Urol*. 2010;58(3):398-406.
7. Ljungberg B, Albiges L, Abu-Ghanem Y, Bensalah K, Dabestani S, Fernandez-Pello S, et al. European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2019 Update. *Eur Urol*. 2019;75(5):799-810.
8. 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. 2016;27(suppl_5):v58-v68.
9. Gray RE, Harris GT. Renal Cell Carcinoma: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician*. 2019;99(3):179-84.
10. Thompson RH, Hill JR, Babayev Y, Cronin A, Kaag M, Kundu S, et al. Metastatic renal cell carcinoma risk according to tumor size. *J Urol*. 2009;182(1):41-5.
11. Janzen NK, Kim HL, Figlin RA, Beldegrun AS. Surveillance after radical or partial nephrectomy for localized renal cell carcinoma and management of recurrent disease. *Urol Clin North Am*. 2003;30(4):843-52.
12. Atkins MB, Tannir NM. Current and emerging therapies for first-line treatment of metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Treat Rev*. 2018;70:127-37.
13. Miller K, Bergmann L, Doehn C, Gschwend JE, Kuczyk MA. [Interdisciplinary recommendations for the treatment of metastatic renal cell carcinoma]. *Aktuelle Urol*. 2019.
14. Muglia VF, Prando A. Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiol Bras*. 2015;48(3):166-74.
15. Lopez-Beltran A, Carrasco JC, Cheng L, Scarpelli M, Kirkali Z, Montironi R. 2009 update on the classification of renal epithelial tumors in adults. *Int J Urol*. 2009;16(5):432-43.
16. Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer*. 2005;114(1):101-8.

17. Bhaskaran K, Douglas I, Forbes H, dos-Santos-Silva I, Leon DA, Smeeth L. Body-mass index and risk of 22 specific cancers: a population-based cohort study of 5.24 million UK adults. *Lancet*. 2014;384(9945):755-65.
18. Weikert S, Boeing H, Pischon T, Weikert C, Olsen A, Tjønneland A, et al. Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Am J Epidemiol*. 2008;167(4):438-46.
19. Ljungberg B, Campbell SC, Cho HY, Jacqmin D, Lee JE, Weikert S, et al. The Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *European Urology*. 2011;60(4):615-21.
20. Yang P, Cornejo KM, Sadow PM, Cheng L, Wang M, Xiao Y, et al. Renal cell carcinoma in tuberous sclerosis complex. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(7):895-909.
21. Cowey CL, Rathmell WK. VHL gene mutations in renal cell carcinoma: role as a biomarker of disease outcome and drug efficacy. *Curr Oncol Rep*. 2009;11(2):94-101.
22. Cheungpasitporn W, Thongprayoon C, O'Corragain OA, Edmonds PJ, Ungprasert P, Kittanamongkolchai W, et al. The risk of kidney cancer in patients with kidney stones: a systematic review and meta-analysis. *QJM*. 2015;108(3):205-12.
23. Wijarnpreecha K, Nissaisorakarn P, Sornprom S, Thongprayoon C, Thamcharoen N, Maneenil K, et al. Hepatitis C infection and renal cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2016;7(4):314-9.
24. Daniel CR, Cross AJ, Graubard BI, Park Y, Ward MH, Rothman N, et al. Large prospective investigation of meat intake, related mutagens, and risk of renal cell carcinoma. *Am J Clin Nutr*. 2012;95(1):155-62.
25. Rohrmann S, Linseisen J, Overvad K, Lund Wurtz AM, Roswall N, Tjønneland A, et al. Meat and fish consumption and the risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E423-31.
26. Deckers IA, van den Brandt PA, van Engeland M, Soetekouw PM, Baldewijns MM, Goldbohm RA, et al. Long-term dietary sodium, potassium and fluid intake; exploring potential novel risk factors for renal cell cancer in the Netherlands Cohort Study on diet and cancer. *Br J Cancer*. 2014;110(3):797-801.
27. Li P, Wong Y-N, Armstrong K, Haas N, Subedi P, Davis-Cerone M, et al. Survival among patients with advanced renal cell carcinoma in the pretargeted versus targeted therapy eras. *Cancer Med*. 2016;5(2):169-81.
28. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020;5(1):28.
29. Gnarra JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet*. 1994;7(1):85-90.
30. Brauch H, Weirich G, Brieger J, Glavac D, Rodl H, Eichinger M, et al. VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation. *Cancer Res*. 2000;60(7):1942-8.
31. Salinas-Sánchez AS, Serrano-Oviedo L, Nam-Cha SY, Roche-Losada O, Sánchez-Prieto R, Giménez-Bachs JM. Prognostic Value of the VHL, HIF-1 α , and VEGF Signaling Pathway and Associated MAPK (ERK1/2 and ERK5) Pathways in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. A Long-Term Study. *Clinical Genitourinary Cancer*. 2017;15(6):e923-e33.

32. Alaghebandan R, Perez Montiel D, Luis AS, Hes O. Molecular Genetics of Renal Cell Tumors: A Practical Diagnostic Approach. *Cancers*. 2019;12(1):85.
33. Şahin Atik S, Solmaz AE, Öztaş Z, Eğrilmez ED, Uğurlu Ş, Atik T, et al. Von Hippel-Lindau Disease: The Importance of Retinal Hemangioblastomas in Diagnosis. *Turk J Ophthalmol*. 2017;47(3):180-3.
34. Frew IJ, Krek W. pVHL: a multipurpose adaptor protein. *Sci Signal*. 2008;1(24):pe30-pe.
35. Moch H. [Von-Hippel-Lindau (VHL) protein function by initiation and progression of renal cancer]. *Pathologe*. 2008;29 Suppl 2:149-52.
36. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999;399(6733):271-5.
37. Cohen HT, McGovern FJ. Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(23):2477-90.
38. Haase VH. The VHL/HIF oxygen-sensing pathway and its relevance to kidney disease. *Kidney Int*. 2006;69(8):1302-7.
39. Wu Y, Lucia K, Lange M, Kuhlen D, Stalla GK, Renner U. Hypoxia inducible factor-1 is involved in growth factor, glucocorticoid and hypoxia mediated regulation of vascular endothelial growth factor-A in human meningiomas. *Journal of neuro-oncology*. 2014;119(2):263-73.
40. Baldewijns MM, van Vlodrop IJ, Vermeulen PB, Soetekouw PM, van Engeland M, de Bruine AP. VHL and HIF signalling in renal cell carcinogenesis. *J Pathol*. 2010;221(2):125-38.
41. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*. 2002;12(1):9-18.
42. Huang D, Ding Y, Luo WM, Bender S, Qian CN, Kort E, et al. Inhibition of MAPK kinase signaling pathways suppressed renal cell carcinoma growth and angiogenesis in vivo. *Cancer Res*. 2008;68(1):81-8.
43. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017;168(6):960-76.
44. Hudes GR. Targeting mTOR in renal cell carcinoma. *Cancer*. 2009;115(10 Suppl):2313-20.
45. Kucejova B, Pena-Llopis S, Yamasaki T, Sivanand S, Tran TA, Alexander S, et al. Interplay between pVHL and mTORC1 pathways in clear-cell renal cell carcinoma. *Mol Cancer Res*. 2011;9(9):1255-65.
46. Populo H, Lopes JM, Soares P. The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci*. 2012;13(2):1886-918.
47. Miricescu D, Balan DG, Tulin A, Stiru O, Vacaroiu IA, Mihai DA, et al. PI3K/AKT/mTOR signalling pathway involvement in renal cell carcinoma pathogenesis (Review). *Exp Ther Med*. 2021;21(5):540.
48. Pantuck AJ, Seligson DB, Klatte T, Yu H, Leppert JT, Moore L, et al. Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma: implications for molecular patient selection for targeted therapy. *Cancer*. 2007;109(11):2257-67.

49. Makhov PB, Golovine K, Kutikov A, Teper E, Canter DJ, Simhan J, et al. Modulation of Akt/mTOR signaling overcomes sunitinib resistance in renal and prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(7):1510-7.
50. Haitel A, Wiener HG, Baethge U, Marberger M, Susani M. mdm2 expression as a prognostic indicator in clear cell renal cell carcinoma: comparison with p53 overexpression and clinicopathological parameters. *Clin Cancer Res.* 2000;6(5):1840-4.
51. El Deeb NMF, Hamza MA, Abou Youssef TM, Ashour GAR. Expression of p21 and PTEN in renal cell carcinoma in correlation with the different clinicopathological parameters. *Egyptian Journal of Pathology.* 2013;33(1).
52. Pertia A, Nikoleishvili D, Trsintsadze O, Gogokhia N, Managadze L, Chkhotua A. Loss of p27(Kip1) CDKI is a predictor of poor recurrence-free and cancer-specific survival in patients with renal cancer. *Int Urol Nephrol.* 2007;39(2):381-7.
53. Leslie NR, Kriplani N, Hermida MA, Alvarez-Garcia V, Wise HM. The PTEN protein: cellular localization and post-translational regulation. *Biochem Soc Trans.* 2016;44(1):273-8.
54. Lim HJ, Crowe P, Yang J-L. Current clinical regulation of PI3K/PTEN/Akt/mTOR signalling in treatment of human cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.* 2015;141(4):671-89.
55. Shin Lee J, Seok Kim H, Bok Kim Y, Cheol Lee M, Soo Park C. Expression of PTEN in renal cell carcinoma and its relation to tumor behavior and growth. *J Surg Oncol.* 2003;84(3):166-72.
56. Hamidi H, Ivaska J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer.* 2018;18(9):533-48.
57. Kechagia JZ, Ivaska J, Roca-Cusachs P. Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2019;20(8):457-73.
58. Fischer C, Georg C, Kraus S, Terpe HJ, Luedecke G, Weidner W. CD44s, E-cadherin and PCNA as markers for progression in renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* 1999;19(2C):1513-7.
59. Landolt L, Eikrem Ø, Strauss P, Scherer A, Lovett DH, Beisland C, et al. Clear Cell Renal Cell Carcinoma is linked to Epithelial-to-Mesenchymal Transition and to Fibrosis. *Physiol Rep.* 2017;5(11).
60. Chen F, Liu X, Cheng Q, Zhu S, Bai J, Zheng J. RUNX3 regulates renal cell carcinoma metastasis via targeting miR-6780a-5p/E-cadherin/EMT signaling axis. *Oncotarget.* 2017;8(60):101042-56.
61. Katagiri A, Watanabe R, Tomita Y. E-cadherin expression in renal cell cancer and its significance in metastasis and survival. *British journal of cancer.* 1995;71(2):376-9.
62. Sobin LH, M K (Mary K); Wittekind, Ch (Christian). *TNM classification of malignant tumours.* 2009.
63. Hartmann JT, Bokemeyer C. Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* 1999;19(2C):1541-3.
64. Makhov P, Joshi S, Ghatalia P, Kutikov A, Uzzo RG, Kolenko VM. Resistance to Systemic Therapies in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Mechanisms and Management Strategies. *Mol Cancer Ther.* 2018;17(7):1355-64.

65. Klapper JA, Downey SG, Smith FO, Yang JC, Hughes MS, Kammula US, et al. High-dose interleukin-2 for the treatment of metastatic renal cell carcinoma : a retrospective analysis of response and survival in patients treated in the surgery branch at the National Cancer Institute between 1986 and 2006. *Cancer*. 2008;113(2):293-301.
66. Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. *Renal-Cell Carcinoma*. 1996;335(12):865-75.
67. Choueiri TK, Motzer RJ. *Systemic Therapy for Metastatic Renal-Cell Carcinoma*. 2017;376(4):354-66.
68. Aziz SA, Sznol J, Adeniran A, Colberg JW, Camp RL, Kluger HM. Vascularity of primary and metastatic renal cell carcinoma specimens. *J Transl Med*. 2013;11:15.
69. Alonso-Gordoa T, García-Bermejo ML, Grande E, Garrido P, Carrato A, Molina-Cerrillo J. Targeting Tyrosine kinases in Renal Cell Carcinoma: "New Bullets against Old Guys". *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(8):1901.
70. Grandinetti CA, Goldspiel BR. Sorafenib and Sunitinib: Novel Targeted Therapies for Renal Cell Cancer. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2007;27(8):1125-44.
71. Motzer RJ, Agarwal N, Beard C, Bolger GB, Boston B, Carducci MA, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology: kidney cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2009;7(6):618-30.
72. European Medicines Agency. European public assessment report (EPAR) for Sutent, EMA/487080/2014. Agency of the European Union. 2014:3.
73. Deng H, Liu W, He T, Hong Z, Yi F, Wei Y, et al. Comparative Efficacy, Safety, and Costs of Sorafenib vs. Sunitinib as First-Line Therapy for Metastatic Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Oncol*. 2019;9:479.
74. Ratain MJ, Eisen T, Stadler WM, Flaherty KT, Kaye SB, Rosner GL, et al. Phase II placebo-controlled randomized discontinuation trial of sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2006;24(16):2505-12.
75. European Medicines Agency. European public assessment report (EPAR) for Nexavar, EMA/274844/2014. Agency of the European Union. 2014:3.
76. European Medicines Agency. European public assessment report (EPAR) for Votrient, EMA/445271/2012. Agency of the European Union. 2013:3.
77. Sternberg CN, Davis ID, Mardiak J, Szczylik C, Lee E, Wagstaff J, et al. Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol*. 2010;28(6):1061-8.
78. European Medicines Agency. European public assessment report (EPAR) for Inlyta, EMA/396564/2015. Agency of the European Union. 2015:3.
79. Hutson TE, Al-Shukri S, Stus VP, Lipatov ON, Shparyk Y, Bair AH, et al. Axitinib Versus Sorafenib in First-Line Metastatic Renal Cell Carcinoma: Overall Survival From a Randomized Phase III Trial. *Clin Genitourin Cancer*. 2017;15(1):72-6.
80. Grimm M-O, Leucht K, Grünwald V, Foller S. New First Line Treatment Options of Clear Cell Renal Cell Cancer Patients with PD-1 or PD-L1 Immune-Checkpoint Inhibitor-Based Combination Therapies. *J Clin Med*. 2020;9(2):565.

81. Matsui J, Funahashi Y, Uenaka T, Watanabe T, Tsuruoka A, Asada M. Multi-Kinase Inhibitor E7080 Suppresses Lymph Node and Lung Metastases of Human Mammary Breast Tumor MDA-MB-231 via Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor (VEGF-R) 2 and VEGF-R3 Kinase. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(17):5459-65.
82. Okamoto K, Kodama K, Takase K, Sugi NH, Yamamoto Y, Iwata M, et al. Antitumor activities of the targeted multi-tyrosine kinase inhibitor lenvatinib (E7080) against RET gene fusion-driven tumor models. *Cancer Letters*. 2013;340(1):97-103.
83. Matsui J, Yamamoto Y, Funahashi Y, Tsuruoka A, Watanabe T, Wakabayashi T, et al. E7080, a novel inhibitor that targets multiple kinases, has potent antitumor activities against stem cell factor producing human small cell lung cancer H146, based on angiogenesis inhibition. *International Journal of Cancer*. 2008;122(3):664-71.
84. European Medicines Agency. European public assessment report (EPAR) for Lenvima, EMA/487404/2018. Agency of the European Union. 2018:3.
85. 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. *Lancet Oncol*. 2015;16(15):1473-82.
86. 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. *J Clin Oncol*. 2013;31(30):3791-9.
87. European Medicines Agency. European public assessment report (EPAR) for Fotivda, EMA/427397/2017. Agency of the European Union. 2017:3.
88. Rini BI, Pal SK, Escudier BJ, Atkins MB, Hutson TE, Porta C, et al. Tivozanib versus sorafenib in patients with advanced renal cell carcinoma (TIVO-3): a phase 3, multicentre, randomised, controlled, open-label study. *Lancet Oncol*. 2020;21(1):95-104.
89. Cochin V, Gross-Goupil M, Ravaud A, Godbert Y, Le Moulec S. [Cabozantinib: Mechanism of action, efficacy and indications]. *Bull Cancer*. 2017;104(5):393-401.
90. European Medicines Agency. European public assessment report (EPAR) for Cabometyx, EMA/290234/2020. Agency of the European Union. 2020:3.
91. Choueiri TK, Escudier B, Powles T, Mainwaring PN, Rini BI, Donskov F, et al. Cabozantinib versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2015;373(19):1814-23.
92. Escudier B, Cosaert J, Jethwa S. Targeted therapies in the management of renal cell carcinoma: role of bevacizumab. *Biologics*. 2008;2(3):517-30.
93. Zhou X, Hou W, Gao L, Shui L, Yi C, Zhu H. Synergies of Antiangiogenic Therapy and Immune Checkpoint Blockade in Renal Cell Carcinoma: From Theoretical Background to Clinical Reality. *Frontiers in oncology*. 2020;10:1321-.
94. Duraiswamy J, Kaluza KM, Freeman GJ, Coukos G. Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors. *Cancer Res*. 2013;73(12):3591-603.

95. Kahlmeyer A, Stöhr CG, Hartmann A, Goebell PJ, Wullich B, Wach S, et al. Expression of PD-1 and CTLA-4 Are Negative Prognostic Markers in Renal Cell Carcinoma. *J Clin Med*. 2019;8(5):743.
96. 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. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(14):1277-90.
97. Diskin B, Adam S, Cassini MF, Sanchez G, Liria M, Aykut B, et al. PD-L1 engagement on T cells promotes self-tolerance and suppression of neighboring macrophages and effector T cells in cancer. *Nature Immunology*. 2020;21(4):442-54.
98. Gulati S, Vaishampayan U. Current State of Systemic Therapies for Advanced Renal Cell Carcinoma. *Current Oncology Reports*. 2020;22(3):26.
99. Kammerer-Jacquet S-F, Deleuze A, Saout J, Mathieu R, Laguerre B, Verhoest G, et al. Targeting the PD-1/PD-L1 Pathway in Renal Cell Carcinoma. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(7):1692.
100. Lalani A-KA, McGregor BA, Albiges L, Choueiri TK, Motzer R, Powles T, et al. Systemic Treatment of Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma in 2018: Current Paradigms, Use of Immunotherapy, and Future Directions. *European Urology*. 2019;75(1):100-10.
101. Chau V, Bilusic M. Pembrolizumab in Combination with Axitinib as First-Line Treatment for Patients with Renal Cell Carcinoma (RCC): Evidence to Date. *Cancer Manag Res*. 2020;12:7321-30.
102. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007;356(22):2271-81.
103. European Medicines Agency. European public assessment report (EPAR) for Torisel, EMA/357540/2017. Agency of the European Union. 2018:3.
104. European Medicines Agency. European public assessment report (EPAR) for Afinitor, EMA/846394/2018. Agency of the European Union. 2018:3.
105. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet*. 2008;372(9637):449-56.
106. Busch J, Seidel C, Weikert S, Wolff I, Kempkensteffen C, Weinkauff L, et al. Intrinsic resistance to tyrosine kinase inhibitors is associated with poor clinical outcome in metastatic renal cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2011;11:295.
107. Porta C, Sabbatini R, Procopio G, Paglino C, Galligioni E, Ortega C. Primary resistance to tyrosine kinase inhibitors in patients with advanced renal cell carcinoma: state-of-the-science. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2012;12(12):1571-7.
108. Seidel C, Busch J, Weikert S, Steffens S, Fenner M, Ganser A, et al. Progression free survival of first line vascular endothelial growth factor-targeted therapy is an important prognostic parameter in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2012;48(7):1023-30.
109. Kroeger N, Choueiri TK, Lee JL, Bjarnason GA, Knox JJ, MacKenzie MJ, et al. Survival outcome and treatment response of patients with late relapse from renal cell carcinoma in the era of targeted therapy. *Eur Urol*. 2014;65(6):1086-92.

110. Han KS, Raven PA, Frees S, Gust K, Fazli L, Ettinger S, et al. Cellular Adaptation to VEGF-Targeted Antiangiogenic Therapy Induces Evasive Resistance by Overproduction of Alternative Endothelial Cell Growth Factors in Renal Cell Carcinoma. *Neoplasia*. 2015;17(11):805-16.
111. Lai Y, Zhao Z, Zeng T, Liang X, Chen D, Duan X, et al. Crosstalk between VEGFR and other receptor tyrosine kinases for TKI therapy of metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Cell International*. 2018;18(1):31.
112. Giuliano S, Cormerais Y, Dufies M, Grépin R, Colosetti P, Belaid A, et al. Resistance to sunitinib in renal clear cell carcinoma results from sequestration in lysosomes and inhibition of the autophagic flux. *Autophagy*. 2015;11(10):1891-904.
113. Gotink KJ, Broxterman HJ, Labots M, de Haas RR, Dekker H, Honeywell RJ, et al. Lysosomal sequestration of sunitinib: a novel mechanism of drug resistance. *Clin Cancer Res*. 2011;17(23):7337-46.
114. Wu S, Huang L, Shen R, Bernard-Cacciarella M, Zhou P, Hu C, et al. Drug resistance-related sunitinib sequestration in autophagolysosomes of endothelial cells. *International journal of oncology*. 2020;56(1):113-22.
115. Lu L, Li Y, Wen H, Feng C. Overexpression of miR-15b Promotes Resistance to Sunitinib in Renal Cell Carcinoma. *J Cancer*. 2019;10(15):3389-96.
116. Choudhari AS, Mandave PC, Deshpande M, Ranjekar P, Prakash O. Phytochemicals in Cancer Treatment: From Preclinical Studies to Clinical Practice. *Front Pharmacol*. 2020;10(1614).
117. Cheung F. TCM: Made in China. *Nature*. 2011;480(7378):S82-S3.
118. Yuan H, Ma Q, Ye L, Piao G. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules*. 2016;21(5).
119. Fung FY, Linn YC. Developing traditional chinese medicine in the era of evidence-based medicine: current evidences and challenges. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:425037.
120. Dias DA, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*. 2012;2(2):303-36.
121. Jong MC, van de Vijver L, Busch M, Fritsma J, Seldenrijk R. Integration of complementary and alternative medicine in primary care: what do patients want? *Patient Educ Couns*. 2012;89(3):417-22.
122. Ahrens M, Hartmann A, Bergmann L. [What is new in the diagnosis and therapy of renal cell carcinoma?]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2020;145(11):734-9.
123. Hierl M, Pfirstinger J, Andreesen R, Holler E, Mayer S, Wolff D, et al. Complementary and Alternative Medicine: A Clinical Study in 1,016 Hematology/Oncology Patients. *Oncology*. 2017;93(3):157-63.
124. Kessel KA, Lettner S, Kessel C, Bier H, Biedermann T, Friess H, et al. Use of Complementary and Alternative Medicine (CAM) as Part of the Oncological Treatment: Survey about Patients' Attitude towards CAM in a University-Based Oncology Center in Germany. *PLoS One*. 2016;11(11):e0165801.

125. Huebner J, Micke O, Muecke R, Buentzel J, Prott FJ, Kleeberg U, et al. User rate of complementary and alternative medicine (CAM) of patients visiting a counseling facility for CAM of a German comprehensive cancer center. *Anticancer Res.* 2014;34(2):943-8.
126. Mani J, Juengel E, Arslan I, Bartsch G, Filmann N, Ackermann H, et al. Use of complementary and alternative medicine before and after organ removal due to urologic cancer. *Patient Prefer Adherence.* 2015;9:1407-12.
127. Rutz J, Maxeiner S, Juengel E, Bernd A, Kippenberger S, Zoller N, et al. Growth and Proliferation of Renal Cell Carcinoma Cells Is Blocked by Low Curcumin Concentrations Combined with Visible Light Irradiation. *Int J Mol Sci.* 2019;20(6).
128. Roos F, Binder K, Rutz J, Maxeiner S, Bernd A, Kippenberger S, et al. The Antitumor Effect of Curcumin in Urothelial Cancer Cells Is Enhanced by Light Exposure In Vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2019;2019:6374940.
129. Juengel E, Maxeiner S, Rutz J, Justin S, Roos F, Khoder W, et al. Sulforaphane inhibits proliferation and invasive activity of everolimus-resistant kidney cancer cells in vitro. *Oncotarget.* 2016;7(51).
130. Rutz J, Juengel E, Euler S, Maxeiner S, Justin S, Roos F, et al. Chronic Sulforaphane Application Does Not Induce Resistance in Renal Cell Carcinoma Cells. *Anticancer Res.* 2018;38(11):6201-7.
131. Makarevic J, Rutz J, Juengel E, Kaufuss S, Reiter M, Tsaur I, et al. Amygdalin blocks bladder cancer cell growth in vitro by diminishing cyclin A and cdk2. *PLoS One.* 2014;9(8):e105590.
132. Mani J, Neuschafer J, Resch C, Rutz J, Maxeiner S, Roos F, et al. Amygdalin Modulates Prostate Cancer Cell Adhesion and Migration In Vitro. *Nutr Cancer.* 2020;72(3):528-37.
133. Juengel E, Thomas A, Rutz J, Makarevic J, Tsaur I, Nelson K, et al. Amygdalin inhibits the growth of renal cell carcinoma cells in vitro. *Int J Mol Med.* 2016;37(2):526-32.
134. Hsiao WL, Liu L. The role of traditional Chinese herbal medicines in cancer therapy--from TCM theory to mechanistic insights. *Planta Med.* 2010;76(11):1118-31.
135. Luo H, Vong CT, Chen H, Gao Y, Lyu P, Qiu L, et al. Naturally occurring anti-cancer compounds: shining from Chinese herbal medicine. *Chin Med.* 2019;14:48.
136. Konstat-Korzenny E, Ascencio Aragon J, Niezen S, Vazquez R. Artemisinin and Its Synthetic Derivatives as a Possible Therapy for Cancer. *Medical Sciences.* 2018;6:19.
137. Boulos JC, Rahama M, Hegazy M-EF, Efferth T. Shikonin derivatives for cancer prevention and therapy. *Cancer Letters.* 2019;459:248-67.
138. Tu Y. Artemisinin: Ein Geschenk der traditionellen chinesischen Medizin an die Welt (Nobel-Aufsatz). *Angewandte Chemie.* 2016;Vol. 128 Issue 35, p10366-10382. 17p.
139. Hsu E. The history of qing hao in the Chinese materia medica. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;100(6):505-8.
140. Newton P, Suputtamongkol Y, Teja-Isavadharm P, Pukrittayakamee S, Navaratnam V, Bates I, et al. Antimalarial Bioavailability and Disposition of Artesunate in Acute Falciparum Malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2000;44(4):972-7.

141. Gopalakrishnan AM, Kumar N. Antimalarial action of artesunate involves DNA damage mediated by reactive oxygen species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(1):317-25.
142. Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A, Miyachi H, Chitambar CR. The anti-malarial artesunate is also active against cancer. *Int J Oncol.* 2001;18(4):767-73.
143. Hamacher-Brady A, Stein HA, Turschner S, Toegel I, Mora R, Jennewein N, et al. Artesunate activates mitochondrial apoptosis in breast cancer cells via iron-catalyzed lysosomal reactive oxygen species production. *J Biol Chem.* 2011;286(8):6587-601.
144. Efferth T, Giaisi M, Merling A, Krammer PH, Li-Weber M. Artesunate induces ROS-mediated apoptosis in doxorubicin-resistant T leukemia cells. *PLoS One.* 2007;2(8):e693.
145. Nunes JJ, Pandey SK, Yadav A, Goel S, Ateeq B. Targeting NF-kappa B Signaling by Artesunate Restores Sensitivity of Castrate-Resistant Prostate Cancer Cells to Antiandrogens. *Neoplasia.* 2017;19(4):333-45.
146. Krishna S, Ganapathi S, Ster IC, Saeed ME, Cowan M, Finlayson C, et al. A Randomised, Double Blind, Placebo-Controlled Pilot Study of Oral Artesunate Therapy for Colorectal Cancer. *EBioMedicine.* 2015;2(1):82-90.
147. Efferth T, Volm M. Glutathione-related enzymes contribute to resistance of tumor cells and low toxicity in normal organs to artesunate. *In Vivo.* 2005;19(1):225-32.
148. Jeong DE, Song HJ, Lim S, Lee SJ, Lim JE, Nam DH, et al. Repurposing the anti-malarial drug artesunate as a novel therapeutic agent for metastatic renal cell carcinoma due to its attenuation of tumor growth, metastasis, and angiogenesis. *Oncotarget.* 2015;6(32):33046-64.
149. Li Z-j, Dai H-q, Huang X-w, Feng J, Deng J-h, Wang Z-x, et al. Artesunate synergizes with sorafenib to induce ferroptosis in hepatocellular carcinoma. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2020.
150. Chen Y, Zheng L, Liu J, Zhou Z, Cao X, Lv X, et al. Shikonin inhibits prostate cancer cells metastasis by reducing matrix metalloproteinase-2/-9 expression via AKT/mTOR and ROS/ERK1/2 pathways. *International Immunopharmacology.* 2014;21(2):447-55.
151. Li J, Cao F, Yin H-l, Huang Z-j, Lin Z-t, Mao N, et al. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death & Disease.* 2020;11(2):88.
152. Kong Z, Liu R, Cheng Y. Artesunate alleviates liver fibrosis by regulating ferroptosis signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2019;109:2043-53.
153. Eling N, Reuter L, Hazin J, Hamacher-Brady A, Brady NR. Identification of artesunate as a specific activator of ferroptosis in pancreatic cancer cells. *Oncoscience.* 2015;2(5):517-32.
154. Greene CJ, Attwood K, Sharma NJ, Gross KW, Smith GJ, Xu B, et al. Transferrin receptor 1 upregulation in primary tumor and downregulation in benign kidney is associated with progression and mortality in renal cell carcinoma patients. *Oncotarget.* 2017;8(63):107052-75.
155. Yu H, Guo P, Xie X, Wang Y, Chen G. Ferroptosis, a new form of cell death, and its relationships with tumourous diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2017;21(4):648-57.

156. Miess H, Dankworth B, Gouw AM, Rosenfeldt M, Schmitz W, Jiang M, et al. The glutathione redox system is essential to prevent ferroptosis caused by impaired lipid metabolism in clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2018;37(40):5435-50.
157. Xie Y, Hou W, Song X, Yu Y, Huang J, Sun X, et al. Ferroptosis: process and function. *Cell Death Differ*. 2016;23(3):369-79.
158. Waldvogel-Abramowski S, Waeber G, Gassner C, Buser A, Frey BM, Favrat B, et al. Physiology of iron metabolism. *Transfus Med Hemother*. 2014;41(3):213-21.
159. Yanatori I, Kishi F. DMT1 and iron transport. *Free Radic Biol Med*. 2019;133:55-63.
160. Gaucher C, Boudier A, Bonetti J, Clarot I, Leroy P, Parent M. Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies. *Antioxidants (Basel)*. 2018;7(5):62.
161. Liu J, Zhang C, Wang J, Hu W, Feng Z. The Regulation of Ferroptosis by Tumor Suppressor p53 and its Pathway. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21).
162. Andujar I, Recio MC, Giner RM, Rios JL. Traditional chinese medicine remedy to jury: the pharmacological basis for the use of shikonin as an anticancer therapy. *Curr Med Chem*. 2013;20(23):2892-8.
163. Song J, Zhao Z, Fan X, Chen M, Cheng X, Zhang D, et al. Shikonin potentiates the effect of arsenic trioxide against human hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2016;7(43):70504-15.
164. Liang W, Cai A, Chen G, Xi H, Wu X, Cui J, et al. Shikonin induces mitochondria-mediated apoptosis and enhances chemotherapeutic sensitivity of gastric cancer through reactive oxygen species. *Sci Rep*. 2016;6:38267.
165. Li X, Fan XX, Jiang ZB, Loo WT, Yao XJ, Leung EL, et al. Shikonin inhibits gefitinib-resistant non-small cell lung cancer by inhibiting TrxR and activating the EGFR proteasomal degradation pathway. *Pharmacol Res*. 2017;115:45-55.
166. Gara RK, Srivastava VK, Duggal S, Bagga JK, Bhatt MLB, Sanyal S, et al. Shikonin selectively induces apoptosis in human prostate cancer cells through the endoplasmic reticulum stress and mitochondrial apoptotic pathway. *Journal of Biomedical Science*. 2015;22(1):26.
167. Wiench B, Eichhorn T, Paulsen M, Efferth T. Shikonin directly targets mitochondria and causes mitochondrial dysfunction in cancer cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;2012:726025.
168. Hou Y, Xu J, Liu X, Xia X, Li N, Bi X. Shikonin induces apoptosis in the human gastric cancer cells HGC-27 through mitochondria-mediated pathway. *Pharmacogn Mag*. 2015;11(42):250-6.
169. Shan ZL, Zhong L, Xiao CL, Gan LG, Xu T, Song H, et al. Shikonin suppresses proliferation and induces apoptosis in human leukemia NB4 cells through modulation of MAPKs and cMyc. *Mol Med Rep*. 2017;16(3):3055-60.
170. Nie Z, Hu G, Wei G, Cui K, Yamane A, Resch W, et al. c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell*. 2012;151(1):68-79.

171. Cheng X, Wei L, Huang X, Zheng J, Shao M, Feng T, et al. Solute Carrier Family 39 Member 6 Gene Promotes Aggressiveness of Esophageal Carcinoma Cells by Increasing Intracellular Levels of Zinc, Activating Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling, and Up-regulating Genes That Regulate Metastasis. *Gastroenterology*. 2017;152(8):1985-97 e12.
172. Miller DM, Thomas SD, Islam A, Muench D, Sedoris K. c-Myc and cancer metabolism. *Clin Cancer Res*. 2012;18(20):5546-53.
173. Guo C, He J, Song X, Tan L, Wang M, Jiang P, et al. Pharmacological properties and derivatives of shikonin—A review in recent years. *Pharmacological Research*. 2019;149:104463.
174. Chen J, Xie J, Jiang Z, Wang B, Wang Y, Hu X. Shikonin and its analogs inhibit cancer cell glycolysis by targeting tumor pyruvate kinase-M2. *Oncogene*. 2011;30(42):4297-306.
175. Li YH, Li XF, Liu JT, Wang H, Fan LL, Li J, et al. PKM2, a potential target for regulating cancer. *Gene*. 2018;668:48-53.
176. Dey P, Son JY, Kundu A, Kim KS, Lee Y, Yoon K, et al. Knockdown of Pyruvate Kinase M2 Inhibits Cell Proliferation, Metabolism, and Migration in Renal Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2019;20(22).
177. Chen C, Xiao W, Huang L, Yu G, Ni J, Yang L, et al. Shikonin induces apoptosis and necroptosis in pancreatic cancer via regulating the expression of RIP1/RIP3 and synergizes the activity of gemcitabine. *Am J Transl Res*. 2017;9(12):5507-17.
178. Qin X, Ma D, Tan Y-x, Wang H-y, Cai Z. The role of necroptosis in cancer: A double-edged sword? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2019;1871(2):259-66.
179. Grootjans S, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview. *Cell Death & Differentiation*. 2017;24(7):1184-95.
180. Liu C, Zhang K, Shen H, Yao X, Sun Q, Chen G. Necroptosis: A novel manner of cell death, associated with stroke (Review). *Int J Mol Med*. 2018;41(2):624-30.
181. Gong Y, Fan Z, Luo G, Yang C, Huang Q, Fan K, et al. The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Molecular Cancer*. 2019;18(1):100.
182. Zelic M, Roderick JE, O'Donnell JA, Lehman J, Lim SE, Janardhan HP, et al. RIP kinase 1-dependent endothelial necroptosis underlies systemic inflammatory response syndrome. *J Clin Invest*. 2018;128(5):2064-75.
183. Brodaczewska KK, Szczylik C, Fiedorowicz M, Porta C, Czarnecka AM. Choosing the right cell line for renal cell cancer research. *Mol Cancer*. 2016;15(1):83.
184. Ashida S, Nishimori I, Tanimura M, Onishi S, Shuin T. Effects of von Hippel-Lindau gene mutation and methylation status on expression of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2002;128(10):561-8.
185. 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.
186. 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.

187. Fogh J. Cultivation, characterization, and identification of human tumor cells with emphasis on kidney, testis, and bladder tumors. *Natl Cancer Inst Monogr.* 1978;49:5-9.
188. Gross AJ, Wolff M, Fandrey J, Miersch WD, Dieckmann KP, Jelkmann W. Prevalence of paraneoplastic erythropoietin production by renal cell carcinomas. *Clin Investig.* 1994;72(5):337-40.
189. Lutz NW, Franks SE, Frank MH, Pomer S, Hull WE. Investigation of multidrug resistance in cultured human renal cell carcinoma cells by ³¹P-NMR spectroscopy and treatment survival assays. *MAGMA.* 2005;18(3):144-61.
190. Williams RD. Human urologic cancer cell lines. *Invest Urol.* 1980;17(5):359-63.
191. Juengel E, Kim D, Makarevic J, Reiter M, Tsaur I, Bartsch G, et al. Molecular analysis of sunitinib resistant renal cell carcinoma cells after sequential treatment with RAD001 (everolimus) or sorafenib. *J Cell Mol Med.* 2015;19(2):430-41.
192. Morgan JF, Morton HJ, Parker RC. Nutrition of Animal Cells in Tissue Culture. I. Initial Studies on a Synthetic Medium. 1950;73(1):1-8.
193. Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods.* 1986;93(2):157-65.
194. Ormerod MG, Tribukait B, Giaretti W. Consensus report of the task force on standardisation of DNA flow cytometry in clinical pathology. DNA Flow Cytometry Task Force of the European Society for Analytical Cellular Pathology. *Anal Cell Pathol.* 1998;17(2):103-10.
195. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 1994;84(5):1415-20.
196. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995;184(1):39-51.
197. Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016;2016(11).
198. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
199. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
200. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981;112(2):195-203.
201. Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(7):3116-20.

202. Fenu M, Bettermann T, Vogl C, Darwish-Miranda N, Schramel J, Jenner F, et al. A novel magnet-based scratch method for standardisation of wound-healing assays. *Scientific Reports*. 2019;9(1):12625.
203. Suarez-Arnedo A, Torres Figueroa F, Clavijo C, Arbeláez P, Cruz JC, Muñoz-Camargo C. An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLOS ONE*. 2020;15(7):e0232565.
204. Abdi H. Bonferroni and Šidák corrections for multiple comparisons. *Encyclopedia of measurement and statistics*. 2007;3:103-7.
205. Wang Y, Hao F, Nan Y, Qu L, Na W, Jia C, et al. PKM2 Inhibitor Shikonin Overcomes the Cisplatin Resistance in Bladder Cancer by Inducing Necroptosis. *Int J Biol Sci*. 2018;14(13):1883-91.
206. Han W, Xie J, Li L, Liu Z, Hu X. Necrostatin-1 reverts shikonin-induced necroptosis to apoptosis. *Apoptosis*. 2009;14(5):674-86.
207. Moran M, Nickens D, Adcock K, Bennetts M, Desscan A, Charnley N, et al. Sunitinib for Metastatic Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis of Real-World and Clinical Trials Data. *Targeted Oncology*. 2019;14(4):405-16.
208. Zhai T, Hei Z, Ma Q, Liang H, Xu Y, Zhang Y, et al. Shikonin induces apoptosis and G0/G1 phase arrest of gallbladder cancer cells via the JNK signaling pathway. *Oncol Rep*. 2017;38(6):3473-80.
209. Yang Y, Gao W, Tao S, Wang Y, Niu J, Zhao P, et al. ER-mediated anti-tumor effects of shikonin on breast cancer. *European Journal of Pharmacology*. 2019;863:172667.
210. Liang W, Cui J, Zhang K, Xi H, Cai A, Li J, et al. Shikonin induces ROS-based mitochondria-mediated apoptosis in colon cancer. *Oncotarget*. 2017;8(65):109094-106.
211. Zhang P, Luo H-S, Li M, Tan S-Y. Artesunate inhibits the growth and induces apoptosis of human gastric cancer cells by downregulating COX-2. *Onco Targets Ther*. 2015;8:845-54.
212. Wen L, Liu L, Wen L, Yu T, Wei F. Artesunate promotes G2/M cell cycle arrest in MCF7 breast cancer cells through ATM activation. *Breast Cancer*. 2018;25(6):681-6.
213. Greenshields AL, Shepherd TG, Hoskin DW. Contribution of reactive oxygen species to ovarian cancer cell growth arrest and killing by the anti-malarial drug artesunate. *Molecular Carcinogenesis*. 2017;56(1):75-93.
214. Lai X-M, Liu S-Y, Tsai Y-T, Sun G-H, Chang S-Y, Huang S-M, et al. HAF mediates the evasive resistance of anti-angiogenesis TKI through disrupting HIF-1 α and HIF-2 α balance in renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(30):49713-24.
215. Butz H, Ding Q, Nofech-Mozes R, Lichner Z, Ni H, Yousef GM. Elucidating mechanisms of sunitinib resistance in renal cancer: an integrated pathological-molecular analysis. *Oncotarget*. 2017;9(4):4661-74.
216. Kamli H, Glenda GC, Li L, Vesey DA, Morais C. Characterisation of the Morphological, Functional and Molecular Changes in Sunitinib-Resistant Renal Cell Carcinoma Cells. *J Kidney Cancer VHL*. 2018;5(3):1-9.
217. Sato T, Kawasaki Y, Maekawa M, Takasaki S, Morozumi K, Sato M, et al. Metabolomic Analysis to Elucidate Mechanisms of Sunitinib Resistance in Renal Cell Carcinoma. *Metabolites*. 2021;11(1):1.

218. Zhao F, Vakhrusheva O, Markowitsch SD, Slade KS, Tsaur I, Cinatl J, et al. Artesunate Impairs Growth in Cisplatin-Resistant Bladder Cancer Cells by Cell Cycle Arrest, Apoptosis and Autophagy Induction. *Cells*. 2020;9(12):2643.
219. Xu Q, Li Z-X, Peng H-Q, Sun Z-W, Cheng R-L, Ye Z-M, et al. Artesunate inhibits growth and induces apoptosis in human osteosarcoma HOS cell line in vitro and in vivo. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2011;12(4):247-55.
220. Greenshields AL, Fernando W, Hoskin DW. The anti-malarial drug artesunate causes cell cycle arrest and apoptosis of triple-negative MDA-MB-468 and HER2-enriched SK-BR-3 breast cancer cells. *Experimental and Molecular Pathology*. 2019;107:10-22.
221. Ma H, Yao Q, Zhang A-M, Lin S, Wang X-X, Wu L, et al. The Effects of Artesunate on the Expression of EGFR and ABCG2 in A549 Human Lung Cancer Cells and a Xenograft Model. *Molecules*. 2011;16(12):10556-69.
222. Cossu-Rocca P, Muroli MR, Sanges F, Sotgiu G, Asunis A, Tanca L, et al. EGFR kinase-dependent and kinase-independent roles in clear cell renal cell carcinoma. *Am J Cancer Res*. 2015;6(1):71-83.
223. Sinou V, Taudon N, Mosnier J, Aglioni C, Bressolle FMM, Parzy D. Pharmacokinetics of artesunate in the domestic pig. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008;62(3):566-74.
224. Organization WH. Guidelines for the treatment of malaria: World Health Organization; 2015.
225. Leitlinie: Diagnostik und Therapie der Malaria. Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin, Reisemedizin und Globale Gesundheit eV (DTG). 2021.
226. Deeken JF, Wang H, Hartley M, Cheema AK, Smaglo B, Hwang JJ, et al. A phase I study of intravenous artesunate in patients with advanced solid tumor malignancies. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2018;81(3):587-96.
227. Ma L, Fei H. Antimalarial drug artesunate is effective against chemoresistant anaplastic thyroid carcinoma via targeting mitochondrial metabolism. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2020;52(2):123-30.
228. Zhang H-T, Wang Y-L, Zhang J, Zhang Q-X. Artemisinin inhibits gastric cancer cell proliferation through upregulation of p53. *Tumor Biology*. 2014;35(2):1403-9.
229. Wang N, Chen H, Teng Y, Ding X, Wu H, Jin X. Artesunate inhibits proliferation and invasion of mouse hemangioendothelioma cells in vitro and of tumor growth in vivo. *Oncology letters*. 2017;14(5):6170-6.
230. Weiss SW, Enzinger FM. Epithelioid hemangioendothelioma: a vascular tumor often mistaken for a carcinoma. *Cancer*. 1982;50(5):970-81.
231. Yu C, Sun P, Zhou Y, Shen B, Zhou M, Wu L, et al. Inhibition of AKT enhances the anti-cancer effects of Artemisinin in clear cell renal cell carcinoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;118:109383.
232. Zhang X, Yang M, Shi H, Hu J, Wang Y, Sun Z, et al. Reduced E-cadherin facilitates renal cell carcinoma progression by WNT/ β -catenin signaling activation. *Oncotarget*. 2017;8(12):19566-76.

-
233. Juengel E, Nowaz S, Makarevi J, Natsheh I, Werner I, Nelson K, et al. HDAC-inhibition counteracts everolimus resistance in renal cell carcinoma in vitro by diminishing cdk2 and cyclin A. *Molecular cancer*. 2014;13:152-.
234. Juengel E, Dauselt A, Makarević J, Wiesner C, Tsaour I, Bartsch G, et al. Acetylation of histone H3 prevents resistance development caused by chronic mTOR inhibition in renal cell carcinoma cells. *Cancer Lett*. 2012;324(1):83-90.
235. Juengel E, Makarević J, Tsaour I, Bartsch G, Nelson K, Haferkamp A, et al. Resistance after Chronic Application of the HDAC-Inhibitor Valproic Acid Is Associated with Elevated Akt Activation in Renal Cell Carcinoma In Vivo. *PLOS ONE*. 2013;8(1):e53100.
236. Jiang Z, Chai J, Chuang HHF, Li S, Wang T, Cheng Y, et al. Artesunate induces G0/G1 cell cycle arrest and iron-mediated mitochondrial apoptosis in A431 human epidermoid carcinoma cells. *Anti-Cancer Drugs*. 2012;23(6).
237. Tran KQ, Tin AS, Firestone GL. Artemisinin triggers a G1 cell cycle arrest of human Ishikawa endometrial cancer cells and inhibits cyclin-dependent kinase-4 promoter activity and expression by disrupting nuclear factor- κ B transcriptional signaling. *Anti-cancer drugs*. 2014;25(3):270-81.
238. Zhang H, Kobayashi R, Galaktionov K, Beach D. p19skp1 and p45skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. *Cell*. 1995;82(6):915-25.
239. Gavet O, Pines J. Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Dev Cell*. 2010;18(4):533-43.
240. Bates S, Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Cell cycle arrest and DNA endoreduplication following p21Waf1/Cip1 expression. *Oncogene*. 1998;17(13):1691-703.
241. Wang S-T, Ho HJ, Lin J-T, Shieh J-J, Wu C-Y. Simvastatin-induced cell cycle arrest through inhibition of STAT3/SKP2 axis and activation of AMPK to promote p27 and p21 accumulation in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death & Disease*. 2017;8(2):e2626-e.
242. Yang Y, Wu N, Wu Y, Chen H, Qiu J, Qian X, et al. Artesunate induces mitochondria-mediated apoptosis of human retinoblastoma cells by upregulating Kruppel-like factor 6. *Cell Death & Disease*. 2019;10(11):862.
243. Chen S, Gan S, Han L, Li X, Xie X, Zou D, et al. Artesunate induces apoptosis and inhibits the proliferation, stemness, and tumorigenesis of leukemia. *Ann Transl Med*. 2020;8(12):767.
244. Roh J-L, Kim EH, Jang H, Shin D. Nrf2 inhibition reverses the resistance of cisplatin-resistant head and neck cancer cells to artesunate-induced ferroptosis. *Redox Biology*. 2017;11:254-62.
245. Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, Maekawa S, Okuno Y, Kamura T, et al. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nature Genetics*. 2013;45(8):860-7.
246. Zou Y, Palte MJ, Deik AA, Li H, Eaton JK, Wang W, et al. A GPX4-dependent cancer cell state underlies the clear-cell morphology and confers sensitivity to ferroptosis. *Nature Communications*. 2019;10(1):1617.

-
247. Tang X, Wu J, Ding C-K, Lu M, Keenan MM, Lin C-C, et al. Cystine Deprivation Triggers Programmed Necrosis in VHL-Deficient Renal Cell Carcinomas. *Cancer research*. 2016;76(7):1892-903.
248. Markowitsch SD, Schupp P, Lauckner J, Vakhrusheva O, Slade KS, Mager R, et al. Artesunate Inhibits Growth of Sunitinib-Resistant Renal Cell Carcinoma Cells through Cell Cycle Arrest and Induction of Ferroptosis. *Cancers*. 2020;12(11):3150.
249. Kang R, Kroemer G, Tang D. The tumor suppressor protein p53 and the ferroptosis network. *Free Radical Biology and Medicine*. 2019;133:162-8.
250. Gnanapradeepan K, Basu S, Barnoud T, Budina-Kolomets A, Kung C-P, Murphy ME. The p53 Tumor Suppressor in the Control of Metabolism and Ferroptosis. *Frontiers in Endocrinology*. 2018;9(124).
251. Lee H, Zandkarimi F, Zhang Y, Meena JK, Kim J, Zhuang L, et al. Energy-stress-mediated AMPK activation inhibits ferroptosis. *Nature Cell Biology*. 2020;22(2):225-34.
252. Miotto G, Rossetto M, Di Paolo ML, Orian L, Venerando R, Roveri A, et al. Insight into the mechanism of ferroptosis inhibition by ferrostatin-1. *Redox Biology*. 2020;28:101328.
253. Mou Y, Zhang Y, Wu J, Hu B, Zhang C, Duan C, et al. The Landscape of Iron Metabolism-Related and Methylated Genes in the Prognosis Prediction of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Frontiers in Oncology*. 2020;10(788).
254. Qin G, Wu L, Liu H, Pang Y, Zhao C, Wu S, et al. Artesunate induces apoptosis via a ROS-independent and Bax-mediated intrinsic pathway in HepG2 cells. *Exp Cell Res*. 2015;336(2):308-17.
255. Xiao Y, Meierhofer D. Glutathione Metabolism in Renal Cell Carcinoma Progression and Implications for Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(15):3672.
256. Hatakeyama H, Fujiwara T, Sato H, Terui A, Hisaka A. Investigation of Metabolomic Changes in Sunitinib-Resistant Human Renal Carcinoma 786-O Cells by Capillary Electrophoresis-Time of Flight Mass Spectrometry. *Biol Pharm Bull*. 2018;41(4):619-27.
257. Yao X, Zhao C-r, Yin H, Wang K, Gao J-j. Synergistic antitumor activity of sorafenib and artesunate in hepatocellular carcinoma cells. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2020.
258. Lachaier E, Louandre C, Godin C, Saidak Z, Baert M, Diouf M, et al. Sorafenib induces ferroptosis in human cancer cell lines originating from different solid tumors. *Anticancer Res*. 2014;34(11):6417-22.
259. Lim JKM, Delaidelli A, Minaker SW, Zhang H-F, Colovic M, Yang H, et al. Cystine/glutamate antiporter xCT (SLC7A11) facilitates oncogenic RAS transformation by preserving intracellular redox balance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019;116(19):9433-42.
260. Jiang L, Kon N, Li T, Wang SJ, Su T, Hibshoosh H, et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature*. 2015;520(7545):57-62.
261. Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*. 2014;156(1-2):317-31.

-
262. Sui X, Zhang R, Liu S, Duan T, Zhai L, Zhang M, et al. RSL3 Drives Ferroptosis Through GPX4 Inactivation and ROS Production in Colorectal Cancer. *Front Pharmacol.* 2018;9:1371-.
263. Gaschler MM, Andia AA, Liu H, Csuka JM, Hurlocker B, Vaiana CA, et al. FINO(2) initiates ferroptosis through GPX4 inactivation and iron oxidation. *Nat Chem Biol.* 2018;14(5):507-15.
264. Hong SH, Lee D-H, Lee Y-S, Jo MJ, Jeong YA, Kwon WT, et al. Molecular crosstalk between ferroptosis and apoptosis: emerging role of ER stress-induced p53-independent PUMA expression. *Oncotarget.* 2017;8(70):115164-78.
265. Park EJ, Choi KS, Yoo YH, Kwon TK. Nutlin-3, a small-molecule MDM2 inhibitor, sensitizes Caki cells to TRAIL-induced apoptosis through p53-mediated PUMA upregulation and ROS-mediated DR5 upregulation. *Anti-Cancer Drugs.* 2013;24(3).
266. Jing W, Dong H, Min M, Runpeng Z, Xuwei X, Ru C, et al. Dependence of artesunate on long noncoding RNA-RP11 to inhibit epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma. *Journal of Cellular Biochemistry.* 2019;120(4):6026-34.
267. Li H, Xu K, Pian G, Sun S. Artesunate and sorafenib: Combinatorial inhibition of liver cancer cell growth. *Oncology letters.* 2019;18(5):4735-43.
268. Hwang HS, Go H, Park J-M, Yoon SY, Lee J-L, Jeong SU, et al. Epithelial-mesenchymal transition as a mechanism of resistance to tyrosine kinase inhibitors in clear cell renal cell carcinoma. *Laboratory Investigation.* 2019;99(5):659-70.
269. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation.* 2009;119(6):1420-8.
270. Piva F, Giulietti M, Santoni M, Occhipinti G, Scarpelli M, Lopez-Beltran A, et al. Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Cell Carcinoma: Implications for Cancer Therapy. *Molecular Diagnosis & Therapy.* 2016;20(2):111-7.
271. Mizumoto A, Yamamoto K, Nakayama Y, Takara K, Nakagawa T, Hirano T, et al. Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition via Activation of Epidermal Growth Factor Receptor Contributes to Sunitinib Resistance in Human Renal Cell Carcinoma Cell Lines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2015;355(2):152-8.
272. Heino J. Cellular signaling by collagen-binding integrins. *Adv Exp Med Biol.* 2014;819:143-55.
273. Li F, Redick SD, Erickson HP, Moy VT. Force measurements of the alpha5beta1 integrin-fibronectin interaction. *Biophys J.* 2003;84(2 Pt 1):1252-62.
274. Ata R, Antonescu CN. Integrins and Cell Metabolism: An Intimate Relationship Impacting Cancer. *International Journal of Molecular Sciences.* 2017;18(1):189.
275. Gilmore AP, Metcalfe AD, Romer LH, Streuli CH. Integrin-Mediated Survival Signals Regulate the Apoptotic Function of Bax through Its Conformation and Subcellular Localization. *Journal of Cell Biology.* 2000;149(2):431-46.
276. Juengel E, Afschar M, Makarević J, Rutz J, Tsaour I, Mani J, et al. Amygdalin blocks the in vitro adhesion and invasion of renal cell carcinoma cells by an integrin-dependent mechanism. *Int J Mol Med.* 2016;37(3):843-50.

-
277. Breuksch I, Prosinger F, Baehr F, Engelhardt F-P, Bauer H-K, Thüroff JW, et al. Integrin $\alpha 5$ triggers the metastatic potential in renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(64):107530-42.
278. Juengel E, Makarević J, Reiter M, Mani J, Tsaour I, Bartsch G, et al. Resistance to the mTOR Inhibitor Temsirolimus Alters Adhesion and Migration Behavior of Renal Cell Carcinoma Cells through an Integrin $\alpha 5$ - and Integrin $\beta 3$ -Dependent Mechanism. *Neoplasia*. 2014;16(4):291-300.
279. Simon KO, Nutt EM, Abraham DG, Rodan GA, Duong LT. The $\alpha \beta 3$ Integrin Regulates $\alpha 5 \beta 1$ -mediated Cell Migration toward Fibronectin*. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(46):29380-9.
280. Wang Z, Symons JM, Goldstein SL, McDonald A, Miner JH, Kreidberg JA. (Alpha)3(beta)1 integrin regulates epithelial cytoskeletal organization. *J Cell Sci*. 1999;112 (Pt 17):2925-35.
281. Yoon HJ, Cho Y-R, Joo J-H, Seo D-W. Knockdown of integrin $\alpha 3 \beta 1$ expression induces proliferation and migration of non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep*. 2013;29(2):662-8.
282. Ramovs V, Secades P, Song J-Y, Thijssen B, Kreft M, Sonnenberg A. Absence of integrin $\alpha 3 \beta 1$ promotes the progression of HER2-driven breast cancer in vivo. *Breast Cancer Research*. 2019;21(1):63.
283. Mezu-Ndubuisi OJ, Maheshwari A. The role of integrins in inflammation and angiogenesis. *Pediatric Research*. 2021;89(7):1619-26.
284. Mautone L, Ferravante C, Tortora A, Tarallo R, Giurato G, Weisz A, et al. Higher Integrin Alpha 3 Beta1 Expression in Papillary Thyroid Cancer Is Associated with Worst Outcome. *Cancers*. 2021;13(12):2937.
285. Du Q, Wang W, Liu T, Shang C, Huang J, Liao Y, et al. High Expression of Integrin $\alpha 3$ Predicts Poor Prognosis and Promotes Tumor Metastasis and Angiogenesis by Activating the c-Src/Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase/Focal Adhesion Kinase Signaling Pathway in Cervical Cancer. *Front Oncol*. 2020;10:36.
286. Juengel E, Natsheh I, Najafi R, Rutz J, Tsaour I, Haferkamp A, et al. Mechanisms behind Temsirolimus Resistance Causing Reactivated Growth and Invasive Behavior of Bladder Cancer Cells In Vitro. *Cancers*. 2019;11(6):777.
287. Markovic-Lipkovski J, Brasanac D, Müller GA, Müller CA. Cadherins and Integrins in Renal Cell Carcinoma an Immunohistochemical Study. *Tumori Journal*. 2001;87(3):173-8.
288. Juengel E, Bhasin M, Libermann T, Barth S, Michaelis M, Cinatl J, et al. Alterations of the gene expression profile in renal cell carcinoma after treatment with the histone deacetylase-inhibitor valproic acid and interferon-alpha. *World Journal of Urology*. 2011;29(6):779-86.
289. Beccafico S, Morozzi G, Marchetti MC, Riccardi C, Sidoni A, Donato R, et al. Artesunate induces ROS- and p38 MAPK-mediated apoptosis and counteracts tumor growth in vivo in embryonal rhabdomyosarcoma cells. *Carcinogenesis*. 2015;36(9):1071-83.
290. Jahangiri A, Nguyen A, Chandra A, Sidorov MK, Yagnik G, Rick J, et al. Cross-activating c-Met/ $\beta 1$ integrin complex drives metastasis and invasive resistance in cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(41):E8685-E94.

291. Buommino E, Baroni A, Canozo N, Petrazzuolo M, Nicoletti R, Voza A, et al. Artemisinin reduces human melanoma cell migration by down-regulating α V β 3 integrin and reducing metalloproteinase 2 production. *Investigational New Drugs*. 2009;27(5):412-8.
292. Kovacheva M, Zepp M, Berger S, Berger MR. Conditional knockdown of integrin beta-3 reveals its involvement in osteolytic and soft tissue lesions of breast cancer skeletal metastasis. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2021;147(2):361-71.
293. Vallo S, Rutz J, Kautsch M, Winkelmann R, Michaelis M, Wezel F, et al. Blocking integrin β 1 decreases adhesion in chemoresistant urothelial cancer cell lines. *Oncology letters*. 2017;14(5):5513-8.
294. Heyder C, Gloria-Maercker E, Hatzmann W, Niggemann B, Zänker KS, Dittmar T. Role of the β 1-integrin subunit in the adhesion, extravasation and migration of T24 human bladder carcinoma cells. *Clinical & Experimental Metastasis*. 2005;22(2):99-106.
295. Tsaor I, Makarević J, Juengel E, Gasser M, Waaga-Gasser AM, Kurosch M, et al. Resistance to the mTOR-inhibitor RAD001 elevates integrin α 2- and β 1-triggered motility, migration and invasion of prostate cancer cells. *British Journal of Cancer*. 2012;107(5):847-55.
296. Zhou X, Sun W-J, Wang W-M, Chen K, Zheng J-H, Lu M-D, et al. Artesunate inhibits the growth of gastric cancer cells through the mechanism of promoting oncosis both in vitro and in vivo. *Anti-Cancer Drugs*. 2013;24(9):920-7.
297. Kirchhofer D, Grzesiak J, Pierschbacher MD. Calcium as a potential physiological regulator of integrin-mediated cell adhesion*. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(7):4471-7.
298. Zhao Q, Kretschmer N, Bauer R, Efferth T. Shikonin and its derivatives inhibit the epidermal growth factor receptor signaling and synergistically kill glioblastoma cells in combination with erlotinib. *International Journal of Cancer*. 2015;137(6):1446-56.
299. Markowitsch SD, Juetter KM, Schupp P, Hauschulte K, Vakhrusheva O, Slade KS, et al. Shikonin Reduces Growth of Docetaxel-Resistant Prostate Cancer Cells Mainly through Necroptosis. *Cancers (Basel)*. 2021;13(4).
300. Kim H-J, Hwang K-E, Park D-S, Oh S-H, Jun HY, Yoon K-H, et al. Shikonin-induced necroptosis is enhanced by the inhibition of autophagy in non-small cell lung cancer cells. *Journal of Translational Medicine*. 2017;15(1):123.
301. Hao Z, Qian J, Yang J. Shikonin induces apoptosis and inhibits migration of ovarian carcinoma cells by inhibiting the phosphorylation of Src and FAK. *Oncol Lett*. 2015;9(2):629-33.
302. Raju D, Md J, Nazrul I, Md. Forhad Chowdhury A, Md. Imran K, Md A, et al. Molecular Insight and Binding Pattern Analysis of Shikonin as a Potential VEGFR-2 Inhibitor. *Current Enzyme Inhibition*. 2017;13(3):235-44.
303. Dash R, Junaid M, Mitra S, Arifuzzaman M, Hosen SMZ. Structure-based identification of potent VEGFR-2 inhibitors from in vivo metabolites of a herbal ingredient. *Journal of Molecular Modeling*. 2019;25(4):98.
304. Guo N, Miao R, Gao X, Huang D, Hu Z, Ji N, et al. Shikonin inhibits proliferation and induces apoptosis in glioma cells via downregulation of CD147. *Mol Med Rep*. 2019;19(5):4335-43.

305. Wei Y, Li M, Cui S, Wang D, Zhang C-Y, Zen K, et al. Shikonin Inhibits the Proliferation of Human Breast Cancer Cells by Reducing Tumor-Derived Exosomes. *Molecules*. 2016;21(6):777.
306. Rai Y, Pathak R, Kumari N, Sah DK, Pandey S, Kalra N, et al. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Scientific Reports*. 2018;8(1):1531.
307. Stepanenko AA, Dmitrenko VV. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*. 2015;574(2):193-203.
308. Su Y, Lu S, Li J, Deng L. Shikonin-mediated up-regulation of miR-34a and miR-202 inhibits retinoblastoma proliferation. *Toxicol Res (Camb)*. 2018;7(5):907-12.
309. CHANDIMALI N, SUN H-N, KONG L-Z, ZHEN X, LIU R, KWON T, et al. Shikonin-induced Apoptosis of Colon Cancer Cells Is Reduced by Peroxiredoxin V Expression. *Anticancer Research*. 2019;39(11):6115-23.
310. Zhang N, Peng F, Wang Y, Yang L, Wu F, Wang X, et al. Shikonin induces colorectal carcinoma cells apoptosis and autophagy by targeting galectin-1/JNK signaling axis. *Int J Biol Sci*. 2020;16(1):147-61.
311. Shahsavari Z, Karami-Tehrani F, Salami S, Ghasemzadeh M. RIP1K and RIP3K provoked by shikonin induce cell cycle arrest in the triple negative breast cancer cell line, MDA-MB-468: necroptosis as a desperate programmed suicide pathway. *Tumour Biol*. 2016;37(4):4479-91.
312. Scaife RM. G₂ cell cycle arrest, down-regulation of cyclin B, and induction of mitotic catastrophe by the flavoprotein inhibitor diphenyleneiodonium. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2004;3(10):1229-37.
313. Huang WW, Tsai SC, Peng SF, Lin MW, Chiang JH, Chiu YJ, et al. Kaempferol induces autophagy through AMPK and AKT signaling molecules and causes G2/M arrest via downregulation of CDK1/cyclin B in SK-HEP-1 human hepatic cancer cells. *Int J Oncol*. 2013;42(6):2069-77.
314. Wang F, Mayca Pozo F, Tian D, Geng X, Yao X, Zhang Y, et al. Shikonin Inhibits Cancer Through P21 Upregulation and Apoptosis Induction. *Front Pharmacol*. 2020;11(861).
315. Tian R, Li Y, Gao M. Shikonin causes cell-cycle arrest and induces apoptosis by regulating the EGFR-NF- κ B signalling pathway in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Biosci Rep*. 2015;35(2):e00189.
316. Li J, Yang X-K, Yu X-X, Ge M-L, Wang W-L, Zhang J, et al. Overexpression of p27(KIP1) induced cell cycle arrest in G(1) phase and subsequent apoptosis in HCC-9204 cell line. *World J Gastroenterol*. 2000;6(4):513-21.
317. Jing H, Sun W, Fan J, Zhang Y, Yang J, Jia J, et al. Shikonin induces apoptosis of HaCaT cells via the mitochondrial, Erk and Akt pathways. *Mol Med Rep*. 2016;13(4):3009-16.
318. Ren Y, Zhang SW, Xie ZH, Xu XM, Chen LL, Lou ZG, et al. Cantharidin induces G2/M arrest and triggers apoptosis in renal cell carcinoma. *Mol Med Rep*. 2016;14(6):5614-8.

-
319. He G, He G, Zhou R, Pi Z, Zhu T, Jiang L, et al. Enhancement of cisplatin-induced colon cancer cells apoptosis by shikonin, a natural inducer of ROS in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;469(4):1075-82.
 320. Jeung YJ, Kim HG, Ahn J, Lee HJ, Lee SB, Won M, et al. Shikonin induces apoptosis of lung cancer cells via activation of FOXO3a/EGR1/SIRT1 signaling antagonized by p300. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(11):2584-93.
 321. Lin H-Y, Han H-W, Wang Y-S, He D-L, Sun W-X, Feng L, et al. Shikonin and 4-hydroxytamoxifen synergistically inhibit the proliferation of breast cancer cells through activating apoptosis signaling pathway in vitro and in vivo. *Chinese Medicine*. 2020;15(1):23.
 322. Ko H, Kim S-J, Shim SH, Chang H, Ha CH. Shikonin Induces Apoptotic Cell Death via Regulation of p53 and Nrf2 in AGS Human Stomach Carcinoma Cells. *Biomol Ther (Seoul)*. 2016;24(5):501-9.
 323. Tu H-C, Ren D, Wang GX, Chen DY, Westergard TD, Kim H, et al. The p53-cathepsin axis cooperates with ROS to activate programmed necrotic death upon DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(4):1093-8.
 324. Klöditz K, Fadeel B. Three cell deaths and a funeral: macrophage clearance of cells undergoing distinct modes of cell death. *Cell Death Discovery*. 2019;5(1):65.
 325. Laurien L, Nagata M, Schünke H, Delanghe T, Wiederstein JL, Kumari S, et al. Autophosphorylation at serine 166 regulates RIP kinase 1-mediated cell death and inflammation. *Nat Commun*. 2020;11(1):1747.
 326. Fu Z, Deng B, Liao Y, Shan L, Yin F, Wang Z, et al. The anti-tumor effect of shikonin on osteosarcoma by inducing RIP1 and RIP3 dependent necroptosis. *BMC Cancer*. 2013;13(1):580.
 327. Al-Lamki RS, Lu W, Manalo P, Wang J, Warren AY, Tolkovsky AM, et al. Tubular epithelial cells in renal clear cell carcinoma express high RIPK1/3 and show increased susceptibility to TNF receptor 1-induced necroptosis. *Cell Death Dis*. 2016;7(6):e2287.
 328. Jokinen J, Dadu E, Nykvist P, Käpylä J, White DJ, Ivaska J, et al. Integrin-mediated cell adhesion to type I collagen fibrils. *J Biol Chem*. 2004;279(30):31956-63.

10 Lebenslauf

11 Publikationen und Veröffentlichungen

Aus der Doktorarbeit sind folgende Publikationen und Kongressbeiträge entstanden:

Publikationen

- 2022 Shikonin inhibits cell growth of sunitinib-resistant renal cell carcinoma by activating the necrosome complex and inhibiting the Akt/mTOR signaling pathway
- Markowitsch SD, Vakhrusheva O, Schupp P, Akele Y, Kitanovic J, Slade KS, Efferth T, Thomas A, Tsaur I, Mager R, Haferkamp A, Juengel E
- Cancers (Basel). 2022 (eingereicht und in Begutachtung)
- 2020 Artesunate Inhibits Growth of Sunitinib-Resistant Renal Cell Carcinoma Cells through Cell Cycle Arrest and Induction of Ferroptosis
- Markowitsch SD, Schupp P, Lauckner J, Vakhrusheva O, Slade KS, Mager R, Efferth T, Haferkamp A, Juengel E
- Cancers (Basel). 2020 Oct 27;12(11):3150. doi: 10.3390/cancers12113150. PMID: 33121039; PMCID: PMC7692972.

Kongressbeiträge

25. – 27.11.2021 Berlin, 12. Symposium Urologische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie
- Shikonin reduziert das Wachstum therapieresistenter Nierenzellkarzinomzellen durch Nekroptose-Induktion, Zellzyklusarrest und Inhibition des AKT/mTOR Signalwegs (Vortrag)
- Markowitsch S, Vakhrusheva O, Schupp P, Akele Y, Kitanovic J, Slade K, Efferth T, Haferkamp A, Juengel E
09. – 11.06.2021 Online, 61. Jahrestagung der Südwestdeutschen Gesellschaft für Urologie e. V.
- Artesunat hemmt in Nierenzellkarzinomzellen das Wachstum und die metabolische Aktivität (Poster)
- Markowitsch S, Schupp P, Lauckner J, Vakhrusheva O, Slade KS, Mager R, Efferth T, Haferkamp A, Juengel E
07. – 08.05.2021 Homburg, 7. Symposium Nierenzelltumoren
- Artesunat induziert einen Wachstumsstopp, alternative Zelltodmechanismen und beeinflusst den Metabolismus von therapieresistenten NZK-Zellen (Vortrag)
- Markowitsch S, Schupp P, Lauckner J, Vakhrusheva O, Slade KS, Mager R, Efferth T, Haferkamp A, Juengel E
21. – 23.11.2019 Tübingen, 11. Symposium Urologische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie
- Artesunat induziert ferroptotische Effekte und reduziert das Zellwachstum in Sunitinib-resistenten Nierenzellkarzinomzelllinien (Poster)
- Markowitsch S, Schupp P, Efferth T, Haferkamp A, Juengel E

18. – 21.09.2019 Hamburg, 71. Jahreskongress der DGU
- Artesunate initiiert einen Zellzyklusarrest und inhibiert das Wachstum vom therapieresistenten Nierenzellkarzinom *in vitro* (Vortrag)
- Markowitsch S, Efferth T, Haferkamp A, Juengel E
- 18.09.2019 Mainz, 6th SCIENCE DAY organized by the TransMed Graduate School of the Johannes Gutenberg University (JGU) Mainz
- Artesunate reduces cell growth and induces ferroptosis in resistant RCC cell lines (Poster)
- Markowitsch S, Schupp P, Schunke J, Efferth T, Haferkamp A, Juengel E
22. – 25.05.2019 Stuttgart, 60. Jahrestagung der Südwestdeutschen Gesellschaft für Urologie e. V.
- Analysen zur Integration von Artesunate aus der traditionellen chinesischen Medizin in die Behandlung von therapieresistenten Nierenzellkarzinomen (Vortrag)
- Markowitsch S, Efferth T, Haferkamp A, Juengel E
- 29.03. – 03.04.2019 Atlanta (USA), AACR Annual Meeting 2019
- Artesunate reduces tumor growth in sunitinib-resistant renal cell carcinoma cells
- Juengel E, Markowitsch S, Erb HH, Efferth T, Haferkamp A

06. – 08.12.2018 Mainz, 10. Symposium Urologische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie
- SHIKONIN REDUZIERT DAS WACHSTUM UND INDUZIERT DIE APOPTOSE BEIM SUNITINIB THERAPIERESISTENTEN NIERENZELLKARZINOM IN VITRO (Vortrag)
- Markowitsch S, Efferth T, Haferkamp A, Juengel E
26. – 29.09.2018 Dresden, 70. Jahreskongress der DGU
- STUDIEN ZUR REVERSION DER THERAPIERESISTENZ BEIM NIERENZELLKARZINOM MITTELS SUBSTANZEN AUS DER TRADITIONELLEN CHINESISCHEN MEDIZIN (Vortrag)
- Markowitsch S, Erb H, Efferth T, Haferkamp A, Juengel E
06. – 09.06.2018 Offenburg, 59. Jahrestagung der Südwestdeutschen Gesellschaft für Urologie e.V.
- Analysen zur Integration von Naturstoffen aus der traditionellen chinesischen Medizin in die Behandlung von therapieresistenten Nierenzellkarzinomen (Vortrag)
- Markowitsch S, Erb H, Efferth T, Haferkamp A, Juengel E
- 06.09.2018 Mainz, 1st UCT Mainz Science Day
- ARTESUNATE REDUCES THE TUMOR GROWTH IN SUNITINIB-RESISTANT RENAL CANCER CELL LINES (Poster)
- Markowitsch S, Erb H, Efferth T, Haferkamp A, Juengel E

04. – 05.05.2018

Saarbrücken, 6. Symposium Nierenzelltumoren

ARTESUNATE REDUZIERT DAS TUMORWACHSTUM IN
THERAPIE-RESISTENTEN NIERENZELLKARZINOM-
ZELLINIEN (Vortrag)

Markowitsch S, Erb H, Efferth T, Haferkamp A, Juengel E

24.08.2017

Mainz, 4th SCIENCE DAY organized by the TransMed
Graduate School of the Johannes Gutenberg University (JGU)
Mainz

Artesunate Reduces Tumour Growth in Therapy Resistant
Renal Cell Carcinoma Cell Lines (Poster)

Markowitsch S, Erb H, Efferth T, Haferkamp A, Juengel E

12 Erklärung

Hiermit erkläre ich, Sascha Dennis Markowitsch, geboren am 29.09.1984 in Dortmund, dass ich meine Dissertation selbstständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe keinen anderen Promotionsversuch unternommen und die vorliegende Arbeit wurde für keine andere Prüfung verwendet.

Mainz,

Ort, Datum