

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

**Die Rolle der extrazellulären Vesikel für die
Resistenzinduktion in Nierenzellkarzinomen unter
Behandlung mit Pazopanib**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2023**

vorgelegt von: Clara Sophia Jungfleisch
geb. am 05.04.1998 in St. Ingbert

Tag der Promotion: 24.07.2023

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

Berichterstatter: Prof. Dr. Kerstin Junker
Prof. Dr. Lorenz Thurner

1. Inhaltsverzeichnis	
1. Inhaltsverzeichnis	1
2. Verzeichnisse.....	4
2.1. Abbildungsverzeichnis.....	4
2.2. Tabellenverzeichnis	5
2.3. Formelverzeichnis.....	6
2.4. Abkürzungsverzeichnis.....	6
3. Zusammenfassung.....	10
3.1. Deutsche Zusammenfassung	10
3.2. Englische Zusammenfassung/ Abstract	11
4. Einleitung; eigene Fragestellung	12
4.1. Grundlagen zum Nierenzellkarzinom.....	12
4.1.1. Epidemiologie	12
4.1.2. Risikofaktoren und Ätiologie	12
4.1.3. Symptomatik.....	13
4.1.4. Diagnostik	14
4.1.5. Staging.....	15
4.1.6. Histopathologische Einteilung	17
4.1.6.1. Klarzellige Nierenzellkarzinome	18
4.1.7. Grading	19
4.1.8. Prognosefaktoren und Prognosebewertung	19
4.1.8.1. Relative 5-Jahres-Überlebensrate	19
4.1.8.2. Prognosefaktoren.....	19
4.1.8.3. Prognosemodelle	20
4.1.9. Therapie.....	20
4.1.9.1. Lokal begrenzte/ nicht metastasierte Tumore	20
4.1.9.2. Fortgeschrittene/ Metastasierte Nierenzellkarzinome	22
4.2. Grundlagen zu Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI)	23
4.2.1. Molekulare Grundlagen	23
4.2.2. Allgemeines Wirkprinzip	24
4.2.3. Pazopanib.....	25
4.2.4. Resistenzentwicklung.....	26
4.2.4.1. Primäre Resistenz	26
4.2.4.2. Sekundäre Resistenz	27
4.3. Grundlagen zu Extrazellulären Vesikeln (EV).....	27
4.3.1. Biogenese der Exosomen	27
4.3.2. Inhalt der Exosomen.....	29

4.3.3.	Funktionen der Exosomen.....	29
4.3.3.1.	Rolle der Exosomen in Tumoren.....	29
4.3.3.2.	Rolle der Exosomen in der Resistenzübertragung	30
4.4.	Zielsetzung/Fragestellung der Doktorarbeit	32
5.	Material und Methodik (oder Beobachtungsgut).....	33
5.1.	Material	33
5.1.1.	Materialien für die Zellkultur	33
5.1.2.	Materialien für die Exosomenisolation	34
5.1.3.	Materialien für das Western Blotting	34
5.1.4.	Materialien für die WST-1-Zellviabilitäts-, Functional- und BCA-Assays	39
5.1.5.	Materialien für das NTA-Assay	39
5.1.6.	Materialien für das Uptake Assay	39
5.1.7.	Verbrauchsmaterial und Pipetten	40
5.2.	Methodik.....	41
5.2.1.	Zellkultur	41
5.2.1.1.	Zelllinie Caki-2 WT und Caki-2 Paz	41
5.2.1.2.	Trypsinierung und Zellzählung.....	42
5.2.1.3.	Passagieren der Caki-2 Paz	43
5.2.1.4.	Einfrieren der Zellen.....	45
5.2.1.5.	Auftauen der Zellen.....	45
5.2.2.	WST-1-Zellviabilitäts-Assay	46
5.2.2.1.	Zellaussaat und Behandlung mit Pazopanib/DMSO	46
5.2.2.2.	Absorptionsmessung mittels Mikrotiterplattenlesegerät.....	47
5.2.2.3.	Vorversuch zu den Resistenztests	47
5.2.2.4.	Bestimmung der IC50	48
5.2.3.	Exosomenisolation	49
5.2.4.	Anzucht der Zellen für die Exosomenisolation	49
5.2.4.1.	Medienwechsel der Triple flasks und Herstellung von ED-FCS.....	50
5.2.4.2.	Differentielle Zentrifugation und Ultrazentrifugation.....	51
5.2.5.	Zelllysate für die SDS-Page.....	52
5.2.6.	BCA-Assay	52
5.2.7.	Western Blotting.....	53
5.2.7.1.	Aliquotierung der Proben.....	53
5.2.7.2.	SDS-PAGE	54
5.2.7.3.	Proteinblotting/ Western Blotting.....	55
5.2.7.4.	Inkubation mit dem Primärantikörper.....	56
5.2.7.5.	Detektion	57

5.2.7.6.	Membrane stripping	58
5.2.8.	Functional Assay	58
5.2.8.1.	Zellaussaat in die 12-Well-Platte	59
5.2.8.2.	Stimulation mit Exosomen in der 12-Well-Platte	60
5.2.8.3.	Zellaussaat in die 96-Well-Platte und Stimulation mit Exosomen....	61
5.2.8.4.	Medikamentengabe in der 96-Well-Platte	61
5.2.8.5.	WST-1-Zellviabilitätstest.....	61
5.2.9.	NTA-Assay	62
5.2.10.	Uptake-Assay	62
5.2.10.1.	Aussaat der Zellen in 4-Well-Objektträger	62
5.2.10.2.	Färbung der Exosomen und Inkubation der Caki-2 WT-Zellen	63
5.2.10.3.	Fixierung der Zellen und Färbung mit Phalloidin.....	64
5.2.10.4.	Mikroskopie.....	65
5.2.10.5.	Statistische Auswertung und Programme	65
6.	Ergebnisse	65
6.1.	Nachweis der Resistenz	65
6.1.1.	Zellkultur	65
6.1.2.	Resistenztestung mittels Pazopanibkonzentrationsreihe.....	66
6.1.3.	Zellviabilität unter 11 μ M Pazopanib	67
6.1.4.	IC50 der Caki-2 WT und Caki-2 Paz.....	68
6.2.	Exosomenisolation	68
6.3.	Qualitätskontrolle der Exosomenisolation	69
6.3.1.	BCA-Assay zur Berechnung der Taschenladung für den Western Blot .	69
6.3.2.	SDS-Page und Western Blot (WB)	70
6.3.3.	Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)	71
6.3.3.1.	Größe und Konzentration der Exosomen von Caki-2 WT	71
6.3.3.2.	Größe und Konzentration der Exosomen von Caki-2 Paz.....	73
6.4.	Uptake Assay	74
6.4.1.	Aufnahme der fluoreszenzmarkierten Exosomen.....	74
6.5.	Überprüfung der Resistenzübertragung im Functional Assay.....	77
6.5.1.	Functional Assay 1 (FA 1)	77
6.5.2.	Functional Assay 3 (FA 3)	79
6.5.3.	Functional Assay 2 (FA 2)	80
6.5.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse der Functional Assays.....	83
7.	Diskussion	85
7.1.	Resistenznachweis	86
7.1.1.	Instabilität der Resistenz.....	87

7.2.	Exosomencharakterisierung	88
7.3.	Exosomeninternalisierung	89
7.4.	Resistenzübertragung	89
7.4.1.	Einordnung der Ergebnisse der Functional Assays	90
7.5.	Schlussfolgerung und Ausblick	99
8.	Literaturverzeichnis	100
9.	Appendix	129
9.1.	IC-50-Experimente für Passage 62/63 (Versuch 3 und 4)	129
9.2.	Western Blots	130
9.2.1.	Western Blot 1	130
9.2.2.	Western Blot 2	131
9.2.3.	Zusatzabbildungen Western Blot 3	132
9.3.	BCA-Analysen für Western Blot 3	133
10.	Dank	134
11.	Lebenslauf	0
2. Verzeichnisse		
2.1. Abbildungsverzeichnis		
	Abbildung 1 Bildung und Freisetzung der extrazellulären Vesikel (EVs).....	28
	Abbildung 2: Belegung der 96-Well-Platte des ersten Vorversuchs zu den Resistenztests ..	48
	Abbildung 3: Belegung der 96-Well-Platte zur Bestimmung der IC50	49
	Abbildung 4: Schema der Taschenbeladung der SDS-PAGE	54
	Abbildung 5: Schema der Membran mit Schnittlinien und Antikörperverteilung.....	56
	Abbildung 6: Belegungsplan der 12-Well-Platte des Functional Assays	60
	Abbildung 7: Belegungsplan der 96-Well-Platte des Functional Assays	61
	Abbildung 8: Belegungsschema der Objektträger bei Uptake-Assay	64
	Abbildung 9 Mikroskopiebilder in 40-facher Vergrößerung	66
	Abbildung 10 Mittelwerte der Zellviabilität (P. 60/61)	67
	Abbildung 11 Mittelwert der Zellviabilität unter 11 μ M Pazopanib (P. 59-61).....	68
	Abbildung 12 Mittelwert der IC50 für die Zellen Caki-2 WT und Caki-2 Paz	68
	Abbildung 13 Western Blot 3 zum Nachweis der exosomalen Marker	70
	Abbildung 14 NTA-Assay der Exosomen von Caki-2 WT (Verdünnung 1:1000)	71
	Abbildung 15 NTA-Assay der Exosomen von Caki-2 WT (Verdünnung 1:500)	72
	Abbildung 16 NTA-Assay der Exosomen von Caki-2 Paz (Verdünnung 1:1000).....	73
	Abbildung 17 NTA-Assay der Exosomen von Caki-2 Paz (Verdünnung 1:500).....	73
	Abbildung 18 Fluoreszenzmikroskopie der Caki-2 WT (Versuch Feld 1)	74
	Abbildung 19 Fluoreszenzmikroskopie der Caki-2 WT (Versuch Feld 2)	75
	Abbildung 20 Fluoreszenzmikroskopie der Caki-2 WT (Negativkontrolle Feld 1)	76

Abbildung 21 Fluoreszenzmikroskopie der Caki-2 WT (Negativkontrolle Feld 2)	77
Abbildung 22 Zellviabilität für FA 1 unter 11 μ M Paz normalisiert zur DMSO-Kontrolle.....	78
Abbildung 23 Zellviabilität für FA 1 normalisiert zu Caki-2 WT/Exo WT unter DMSO.....	78
Abbildung 24 Zellviabilität für FA 3 unter 11 μ M Paz normalisiert zur DMSO-Kontrolle.....	79
Abbildung 25 Zellviabilität für FA 3 normalisiert zu Caki-2 WT/Exo WT unter DMSO.....	80
Abbildung 26 Zellviabilität für FA 2 unter 11 μ M Paz normalisiert zur DMSO-Kontrolle.....	80
Abbildung 27 Zellviabilität für FA 2 normalisiert zu Caki-2 WT/Exo WT unter DMSO.....	81
Abbildung 28 Vergleich der Mittelwerte der Viabilität unter 11 μ M Paz der gleichen Charge	83
Abbildung 29 Zellviabilität FA 1-3 unter 11 μ M Paz normalisiert zur DMSO-Kontrolle.....	83
Abbildung 30 Zellviabilität FA 1-3 normalisiert zu Caki-2 WT/Exo WT unter DMSO.....	84
Abbildung 31 Mittelwerte der Zellviabilität (P. 62/63)	129
Abbildung 32 Mittelwert der Zellviabilität unter 11 μ M Pazopanib (P. 62/63)	129
Abbildung 33 Mittelwert der IC50 für Caki-2 WT und Caki-2 Paz (P. 62/63).....	130
Abbildung 34 Western Blot 1	130
Abbildung 35 Western Blot 2 zum Nachweis der exosomalen Marker	131
Abbildung 36 Zusatzabbildungen Western Blot 3	132
Abbildung 37 BSA-Standardkurven	133

2.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 TNM-Klassifikation Nierentumoren (ICD-O-3 C64).....	16
Tabelle 2 Stadieneinteilung von Nierenzelltumoren	17
Tabelle 3 WHO-Klassifikation der Nierenzelltumore 2022	18
Tabelle 4: Materialien für die Zellkultur	34
Tabelle 5: Materialien für die Exosomenisolation	34
Tabelle 6: Materialien für das Western Blotting.....	35
Tabelle 7: Liste der Puffer und Reagenzien	38
Tabelle 8: Liste der Primär- und Sekundärantikörper.....	39
Tabelle 9: Materialien für die WST-1-Cell-viability-, Functional- und BCA-Assays	39
Tabelle 10: Materialien für das NTA-Assay	39
Tabelle 11: Materialien für das Uptake-Assay	40
Tabelle 12: Liste der Verbrauchsmaterialien und Pipetten	41
Tabelle 13 Verwendete Volumina bei der Trypsinierung.....	43
Tabelle 14: Volumina des Pazopanibstock 1 (100 μ M) und des Mediums + Zellen.....	44
Tabelle 15: Einstellungen der Kanäle und der Wellenlängen bei der Mikroskopie.....	65
Tabelle 16 Auflistung der Exosomenisolationen.....	69
Tabelle 17 Konzentrationen der zum Western Blot verwendeten Proben	69
Tabelle 18 NTA-Messergebnisse der Exosomen der Caki-2 WT	72
Tabelle 19 NTA-Messergebnisse der Exosomen der Caki-2 Paz.....	74

2.3. Formelverzeichnis

Formel 1: Allgemeine Berechnung von Verdünnungen.....	42
Formel 2: Volumina bei der Pazopanibgabe nach der Trypsinierung von Caki-2 Paz.....	44
Formel 3: Vorzulegendes Volumen an Medium bei der Trypsinierung von Caki-2 Paz.....	44
Formel 4: Volumen von Paz (Stock 0) zur Herstellung von 1 ml Stock 1	45
Formel 5: Volumen des Mediums zur Herstellung von 1 ml Stock 1	45
Formel 6: Beispiele für Normalisierung zu Caki-2 WT unter DMSO.....	47
Formel 7: Exosomenvolumen für 8 µg/ml in der 12-Well-Platte.....	59
Formel 8: Volumen des Mediums zu dem die Zellsuspension im FA pipettiert wurde	59
Formel 9: Volumen des Mediums bei Medienwechsel und Stimulation in 12-Well-Platte.....	60

2.4. Abkürzungsverzeichnis

ABCG2	ATP-binding cassette efflux transporter G2
ACKD	Acquired cystic kidney disease
ADAM/ ADAMTS	A Disintegrin and Metalloproteinase/ A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs
ALT	Alanin-Aminotransferase
Aqua dest.	Aqua destillata
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BAP1	BRCA1 associated protein-1
BCA	Bicinchoninic acid
Bcl-2/ Bcl-X _L	B-cell lymphoma-2/ B-cell lymphoma-extra-large
BSA	Bovines Serumalbumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CAA	cancer associated adipocytes
CAF	cancer associated fibroblasts
Caki-2 Paz	Pazopanibresistente Caki-2 Zellen
Caki-2 WT	Caki-2 Wildtypzellen
CAM	Cell adhesion molecule
CCL24	C–C motif chemokine ligand 24
CCR3	C–C motif chemokine receptor 3
CD	Cluster of differentiation
CSC	cancer stem cells
CT	Computertomographie
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen-4

CXCR4	CXC chemokine receptor 4
CYP3A4	Cytochrom P450 3A4
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DLL-4	Delta-like ligand 4
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	Dithioerythrit
DTT	Dithiothreitol
EAU	European Association of Urology
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
ED	exosomendepletiert
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMA	European Medicines Agency
EPO	Erythropoetin
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
EV	Extrazelluläre Vesikel
Exo	Exosomen
Exo-Paz	Exosomen der Caki-2 Paz
Exo-WT	Exosomen der Caki-2 WT
FA	Functional Assay
FCS	Fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FDA	Food and Drug Administration
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GLUT	Glucose transporter
GM130	Golgi-Matrix-Protein 130
HER-2	human epidermal growth factor receptor 2
HGF	Hepatocyte growth factor
HIF	Hypoxia-inducible factor
HRP	Horseradish peroxidase
Hsc	heat-shock cognate
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL	Interleukin
ILV	Intraluminale Vesikel
IMDC	International Metastatic Renal Cancer Database Consortium

KDM5C	Lysine-specific demethylase 5C
kzNZK	Klarzelliges Nierenzellkarzinom
LDH	Laktatdehydrogenase
lncRNA HAR1B	long non-coding RNA highly accelerated region 1B
MDR-1	Multidrug resistance-1
MDSC	myeloid-derived suppressor cells
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasekinase
MHC	major histocompatibility complex
MLH-1	MutL homolog 1
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MRT	Magnetresonanztomographie
MSKCC	Memorial Sloan Kettering Cancer Center
mTOR	mammalian target of rapamycin
MVB	Multivesicular Body
NADH	Reduzierte Form von Nicotinamidadenindinucleotid
NTA	Nanoparticle tracking analysis
P-gp	P-Glykoprotein
P.	Passage
Palm	Palmitoylation
Paz	Pazopanib
Pazopanib HCl	Pazopanib Hydrochlorid
PBRM1	Polybromo 1
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	PBS mit 0,1% Triton X
PD-1	Programmed death- 1
PD-L1	programmed death-ligand 1
PDGF	platelet- derived growth factor
PenStrep	Penicillin-Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PFS	Progression free survival
PIGF	Placental growth factor
PVDF	Polyvinylidendifluorid
pVHL	von Hippel–Lindau protein
Rab	Ras-associated binding proteins
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SBF2-AS1	SET-binding Factor 2 Antisense RNA 1

SDS	sodium dodecylsulfate
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SETD2	SET domain containing 2
SSIGN	Stage, Size, Grade, and Necrosis
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
T-ALL	akute lymphatische T-Zelleukämie
TAM	tumorassoziierte Makrophagen
TBST	Tris-buffered saline with Tween 20
tdTomato	tandem dimer Tomato
TGF	Transforming growth factor
TME	Tumor Microenvironment
TNF	Tumornekrosefaktor
TSG-101	Tumor susceptibility gene 101
UCLA	University of California Los Angeles
UICC	Union for International Cancer Control
V.a.	Verdacht auf
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
VHL	von Hippel-Lindau
WB	Western Blot
WHO	World Health Organization
WST-1	Water Soluble Tetrazolium Salt-1

3. Zusammenfassung

3.1. Deutsche Zusammenfassung

Die Resistenzentwicklung gegen Systemtherapien stellt ein großes therapeutisches Problem dar. Von zunehmendem Interesse ist hierbei der Einfluss der extrazellulären Vesikel bei der Resistenzübertragung. Für das Nierenzellkarzinom, das eine häufige uroonkologische Entität darstellt, wurde dies bisher nur für Sunitinib und Sorafenib untersucht. Die vorliegende Dissertation soll Einblicke in die Rolle der extrazellulären Vesikel für die Resistenzinduktion in Nierenzellkarzinomen unter der Behandlung mit Pazopanib vermitteln.

In dieser Arbeit wurden Caki-2 Wildtypzellen (Caki-2 WT) und pazopanibresistente Caki-2 (Caki-2 Paz) eingesetzt, die durch die kontinuierliche Kultivierung mit 11 μM Pazopanib eine Resistenz entwickelt hatten. Zur Bestätigung der Resistenz und der Ermittlung der IC50 wurden WST-1-Viabilitätstests eingesetzt. Die Qualitätskontrolle der Exosomenisolation erfolgte mittels Western Blot und NTA-Assay. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurde die Exosomeninternalisierung überprüft. Bei den Experimenten zur Resistenzübertragung wurden die Caki-2 WT mit den Exosomen der resistenten Zelllinie und jenen der Wildtypzellen in verschiedenen Konzentrationen (8 und 20 $\mu\text{g/ml}$) vorbehandelt, anschließend mit 11 μM Pazopanib oder DMSO behandelt und Viabilität mittels WST-1-Test gemessen.

Die IC50 der Caki-2 Paz lag bei 16,1 μM und war signifikant höher als die der Wildtypzellen mit 11,1 μM ($p=0,027$). Die Viabilität der Caki-2 Paz lag unter 11 μM bei 96,5% und unterschied sich signifikant von jener der Caki-2 WT mit 48,9% ($p=0,0022$), sodass die Resistenz der Caki-2 Paz nachgewiesen wurde. Im Western Blot konnten exosomale Marker (CD9, CD63, Alix, Syntenin) in den Exosomenisolationen nachgewiesen werden, während GM-130 als zellulärer Kontaminationsmarker nicht detektiert wurde. Die Modalwerte der Partikelgröße der Exosomen der Caki-2 WT und der Caki-2 Paz lagen in einem für Exosomen typischen Größenbereich zwischen 109,9 \pm 1,3 nm und 152,5 \pm 5,4 nm, wobei sich die Konzentrationen nicht signifikant zwischen den Zelllinien unterschieden ($p=0,92$). Die Aufnahme der PKH26-markierten Exosomen wurde erfolgreich fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen. In 2 von 3 Versuchen konnten die Exosomen der Caki-2 Paz die Viabilität der Caki-2 WT nicht beeinflussen und somit die Resistenz nicht übertragen. In nur einem Versuch wurde eine Viabilitätssteigerung sowohl unter DMSO (123%) als auch unter 11 μM Pazopanib (117%) bei den mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Paz-Exosomen vorbehandelten Caki-2 WT-Zellen festgestellt (normalisiert zu Caki-2 WT/Exo-WT unter DMSO). Im Rahmen dieses Versuchs fiel jedoch ein Wirkverlust von Pazopanib auf, weshalb die Zellen in diesem Versuch nur gering auf die Pazopanibbehandlung ansprachen und der Versuch mit einer anderen Charge wiederholt werden musste, wobei die Viabilitätssteigerung nicht reproduziert werden konnte. Da die Frage der exosomalen Resistenzübertragung für Pazopanib im Nierenzellkarzinom nicht abschließend geklärt werden konnte, sollten in Zukunft weitere Versuche erfolgen, wobei die

Zentrifugalkraft, die Dauer der Exosomenstimulation aber auch die verwendeten Pazopanibkonzentrationen sowie die Zelllinie variiert werden könnte. Dieses Projekt verdeutlicht, wie störungsanfällig solche funktionellen Untersuchungen sind und wie wichtig ein einheitliches methodisches Vorgehen bei Studien zu extrazellulären Vesikeln und der Übertragung von Medikamentenresistenzen ist, um eine gute Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit zu erreichen.

3.2. Englische Zusammenfassung/ Abstract

The role of extracellular vesicles in the induction of resistance against Pazopanib in Renal Cell Carcinomas

The development of resistance to systemic therapies is a major therapeutic issue. In this context, the influence of extracellular vesicles in the transmission of resistance is of increasing interest. In renal cell carcinoma, which is a common uro-oncologic entity, this has only been studied for sunitinib and sorafenib. This doctoral thesis aims to provide insights into the role of extracellular vesicles in the induction of resistance against pazopanib in renal cell carcinomas. The wild-type Caki-2 (Caki-2 WT) and the pazopanib-resistant Caki-2 (Caki-2 Paz) cells that had developed resistance by continuous culture with 11 μ M pazopanib were used. In order to confirm the resistance and to determine the IC₅₀ the WST-1 viability assay was used. The quality control of the exosome isolation was performed by Western blot and NTA assay. As a control of the exosome internalization fluorescence microscopy was used. In the drug resistance transfer experiments, Caki-2 WT were pretreated with the exosomes of the resistant cell line and those of the wild-type cells at different concentrations (8 and 20 μ g/ml), then treated with 11 μ M pazopanib or DMSO, and the viability was measured by WST-1 assay.

The IC₅₀ of Caki-2 Paz (16.1 μ M) was significantly higher than that of the wild-type cells (11.1 μ M, $p=0.027$). The viability of Caki-2 Paz under 11 μ M was 96.5% and significantly different from that of Caki-2 WT (48.9%, $p=0.0022$), demonstrating the resistance of Caki-2 Paz. Western blot detected exosomal markers (CD9, CD63, Alix, Syntenin) in the exosome isolations, while GM-130 as a marker of cellular contamination could not be detected. The modal values of the particle size of the exosomes of Caki-2 WT and Caki-2 Paz were typical for exosomes ranging from 109.9 +/- 1.3 nm to 152.5 +/- 5.4 nm, and concentrations were not significantly different between the cell lines ($p=0.92$). The uptake of PKH26-labeled exosomes was successfully confirmed by fluorescence microscopy. In 2 of 3 experiments, Caki-2 Paz exosomes failed to affect the viability of the Caki-2 WT cells and thus failed to confer resistance. In only one experiment, an increased viability was observed under both DMSO (123%) and 11 μ M pazopanib (117%) in Caki-2 WT cells pretreated with 20 μ g/ml Paz exosomes (normalized to Caki-2 WT/Exo-WT under DMSO).

However, a loss of the effect of pazopanib was noticed in this experiment, and therefore the cells in this experiment showed only a low response to the pazopanib treatment and the

experiment had to be repeated with a different batch. Unfortunately, the increase of viability could not be reproduced. Since the issue of exosomal transfer of resistance to pazopanib in renal cell carcinoma could not be conclusively addressed, further experiments should be performed in the future, where the centrifugal force, the duration of exosome stimulation but also the pazopanib concentrations used as well as the cell line could be varied. This project illustrates the susceptibility for interferences of such functional studies and the importance of a uniform methodological approach to extracellular vesicle and drug resistance transfer studies, to achieve good comparability and reproducibility.

4. Einleitung; eigene Fragestellung

4.1. Grundlagen zum Nierenzellkarzinom

4.1.1. Epidemiologie

Die Tumore der Niere belegten in Deutschland im Jahr 2018 mit 2,4% bei Frauen, den 10. und mit 3,5% bei Männern den 9. Platz der Krebsneuerkrankungen [229]. Die mit 90% der Fälle weitaus häufigste Entität der bösartigen Nierentumore stellt hierbei das Nierenzellkarzinom dar [161]. Unter den urologischen Tumorneuerkrankungen war das Nierenzellkarzinom in Deutschland 2018 beim Mann nach den Tumoren von Prostata und Harnblase der dritthäufigste und bei der Frau der häufigste Tumor [229,338]. Die Inzidenz lag laut RKI im Jahr 2018 bei 5.480 Neuerkrankungen bei Frauen und 9.350 Neuerkrankungen bei Männern [229]. Insgesamt zeigt die Inzidenz eine leicht steigende Tendenz insbesondere bei Männern [341]. Mit einem mittleren Erkrankungsalter von 71 Jahren bei der Frau und 68 Jahren beim Mann stellt das Nierenzellkarzinom einen Tumor des höheren Erwachsenenalters dar [229]. Bezogen auf die relative 5-Jahres-Überlebensrate von 76% (bei Frauen) bzw. 78% (bei Männern) hat das Nierenzellkarzinom insgesamt eine recht günstige Prognose, die jedoch stadienabhängig ist [229].

Nach einem Anstieg der Mortalitätsrate des Nierenzellkarzinoms in den Jahren 1990-1994 in der EU (auf 4,8/100.000 Männer bzw. 2,1/100.000 Frauen), sanken die Mortalitätsraten in den Jahren 2000-2004 (auf 4,1/100.000 Männer bzw. 1,8/100.000 Frauen) [155]. Dieser Trend wurde vor allem in westeuropäischen und skandinavischen Ländern beobachtet, wohingegen in östlicheren Ländern wie Tschechien sich die Raten auf einem hohen Niveau stabilisierten [155].

4.1.2. Risikofaktoren und Ätiologie

Zu den typischen Risikofaktoren des Nierenzellkarzinoms (NZK) zählen Übergewicht [169], Rauchen [113,169,273] und Bluthochdruck [42,161]. Eine antihypertensive Medikation wirkt, sofern der Blutdruck unter dieser Therapie kontrolliert ist, risikoreduzierend [241,301]. Auch Trichlorethylen, das vor allem in der Metall- und Chemieindustrie genutzt wird, steht im Zusammenhang mit der Entwicklung von NZK [161]. Alkohol hingegen führt bei moderatem Konsum zu einer leichten Risikoreduktion [31,311]. Bei Patienten unter Dialyse mit terminaler

Niereninsuffizienz und erworbener zystischer Nierenerkrankung (ACKD) besteht ein erhöhtes Risiko für NZK [107,172,176].

Das NZK tritt sowohl sporadisch [30] als auch in 2-4% der Fälle als hereditäre Keimbahnmutation mit autosomal dominanter Vererbung oder als de novo-Mutation auf [181]. Zu diesen hereditären Formen zählen das von Hippel-Lindau-Syndrom, das Birt-Hogg-Dubbé-Syndrom, die tuberöse Sklerose, das mit hereditärer Leiomyomatose assoziierte Nierenzellkarzinom, die hereditären papillären Nierenzellkarzinome [30], aber auch seltenere Entitäten, wie zum Beispiel die Succinat-Dehydrogenase-Defizienz-assoziierten oder die hereditären BAP-1 assoziierten NZK [171]. Hinweise auf das Vorliegen einer hereditären Form sind zum Beispiel das Auftreten im jungen Erwachsenenalter, die Multifokalität bzw. das bilaterale Auftreten, Besonderheiten in der Histologie, weitere Symptome des jeweiligen Syndroms sowie eine positive Familienanamnese [181]. Besonders hervorzuheben ist das von Hippel-Lindau-Syndrom (VHL-Syndrom) als häufigstes vererbtes Syndrom [26], das mit Hämangiomen der Retina und des zentralen Nervensystems, klarzelligem Nierenzellkarzinomen (kzNZK), Phäochromozytomen sowie Tumoren des endokrinen Pankreas und des Saccus endolymphaticus imponiert [170,171]. Außerdem werden hier Zysten in verschiedenen Organen, u. a. der Niere, beobachtet [170]. Das dabei betroffene VHL-Tumorsupressorgen befindet sich auf Chromosom 3p25-26 [150], wo auch bei den sporadischen klarzelligem Nierenzellkarzinomen somatische Mutationen (bei über 50%) oder Hypermethylierungen (bei 10-20%) gefunden werden und bei bis zu 98% ein Verlust der Heterozygotie vorliegt [78,137]. Entsprechend dem „two-hit“-Modell nach Knudson [142] erfolgt die erste Mutation bei der hereditären Form in der Keimbahn und bei der sporadischen Form durch eine somatische Mutation, Hypermethylierung oder den Verlust des kurzen Arms von Chromosom 3p [48], während die zweite Mutation sowohl bei der sporadischen als auch der hereditären Form somatisch ist [137,142]. Das Genprodukt pVHL ist Bestandteil des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes [5], der die Transkriptionsfaktoren HIF1 α und HIF2 α unter Normoxie zum Abbau markiert [257]. Unter Hypoxie findet diese Markierung nicht statt und die Transkriptionsfaktoren bewirken als Folge dessen unter anderem eine vermehrte Transkription der Gene von VEGF, PDGF und Glukosetransportern [257]. Durch die Mutationen des VHL-Gens kommt es genau wie unter Hypoxie nicht zur Ubiquitinierung von HIF und somit zur Kumulation der dadurch regulierten proangiogenetischen und wachstums- bzw. stoffwechselfördernden Substanzen [38,85]. Dieser Zusammenhang wird therapeutisch genutzt (siehe 4.2.).

4.1.3. Symptomatik

Nierenzellkarzinome präsentieren sich meist asymptomatisch und werden deshalb häufig inzidentell, also im Rahmen von bildgebenden Untersuchungen wie z. B. Ultraschall-, CT- oder MRT, die unabhängig vom Nierenzellkarzinom aufgrund anderer abdomineller Beschwerden

erfolgten, entdeckt [203,204]. Dieses Phänomen bietet auch einen möglichen Erklärungsansatz für die Beobachtung, dass gleichwohl die Inzidenz durch den heutzutage breiteren Einsatz bildgebender Maßnahmen einen leichten Anstieg verzeichnet [203], dennoch die Mortalitätsraten gleichbleiben oder sogar absinken, weil die Tumore häufiger in einem früheren Stadium entdeckt werden [43]. Dennoch werden immer noch etwa 20% der Nierenzellkarzinome erst im fortgeschrittenen oder metastasierten Stadium diagnostiziert [49,263]. Die klassische Symptomtrias aus Hämaturie, Flankenschmerz und einem palpablen Tumor findet man in der körperlichen Untersuchung nur bei einem kleinen Teil (<10%) der Patient*innen [202,206]. Weitere Symptome schließen metastasierungsassoziierte Schmerzen (z. B. Knochenschmerzen) und paraneoplastische Syndrome mit ein [228,308]. Es kann unter anderem zu Fieber, Anämie, Gewichtsverlust, Hyperkalzämie, zum Cushing-Syndrom, zum Stauffer-Syndrom und anderen deutlich selteneren Symptomen wie einer linksseitigen Varikozele kommen [202,228,231].

4.1.4. Diagnostik

Aufgrund der häufig inzidentellen Diagnose des Nierenzellkarzinoms (siehe 4.1.3) spielt die körperliche Untersuchung eine eher kleine Rolle bei der Detektion [62]. Bei auffälligen Befunden, wie z. B. einem palpablen abdominellen Tumor, einer zervikalen Lymphknotenschwellung, einer sekundären Varikozele oder Ödemen der unteren Extremität sollte beim Patienten eine Bildgebung erfolgen [62]. Die typischen Laboruntersuchungen schließen Kreatinin, GFR, das große Blutbild, BSG, LDH, Leberwerte, die alkalische Phosphatase, Serumcalcium, sowie den Gerinnungs- und Urinstatus mit ein [62]. Bei Patient*innen mit einer funktionellen Einzelniere oder erhöhten Kreatininwerten kann zusätzlich die seitengetrennte Nierenfunktion über eine Szintigraphie ermittelt werden [62]. Durch seine weit verbreitete klinische Anwendung trägt der Ultraschall zur inzidentellen Detektion der NZK bei [20]. Die S3-Leitlinie zum Nierenzellkarzinom empfiehlt zur Diagnosesicherung und zum Staging präoperativ ein natives CT, sowie ein CT in früharterieller und venöser Phase, mit einer Darstellung ausgehend von der Leberkuppe bis zur Symphyse bzw. bis zum Beckeneingang [153]. Während bei kleineren Tumoren und zur Resektionsplanung das CT die Bildgebung der Wahl ist, sollte bei Anzeichen für eine Beteiligung der Vena cava, z. B. in Form eines Tumorzapfens, eine MRT-Untersuchung erfolgen [153]. Das MRT eignet sich besonders, um die Lage und Ausdehnung des Tumorthrombus zu bestimmen [153].

Raumforderungen der Niere können sich entweder solide oder zystisch präsentieren [192], wobei nach den Änderungen der Bosniak-Klassifikation von 2019 eine zystische Läsion dann vorliegt, wenn der Tumor ein Enhancement in weniger als 25% seiner Masse zeigt [234]. Diese neue Version der Bosniak-Klassifikation ermöglicht eine Einschätzung der Dignität einer zystischen Läsion mittels CT- aber auch MRT- oder Sonographiebefunden anhand

verschiedener Kriterien, wie z. B. Verkalkungen, Septen oder deren Verdickung etc. und teilt die Befunde in 5 Kategorien ein [192,234].

Den Empfehlungen der S3-Leitlinie folgend sollte bei Tumoren mit einer Größe >3cm ein CT des Thorax erfolgen, um pulmonale Metastasen auszuschließen. Laut Leitlinie sollte nur bei klinischen Verdachtsmomenten eine Untersuchung hinsichtlich einer zerebralen oder ossären Metastasierung erfolgen. Hierbei sollte die Wahl auf das kontrastmittelverstärkte Schädel-MRT bei V. a. zerebrale Metastasierung sowie das low-dose Ganzkörper-CT oder -MRT bei V. a. ossäre Metastasierung fallen [153].

Eine Biopsie erfolgt nicht standardmäßig, kann aber in bestimmten Situationen eingesetzt werden, wie z. B. vor einer ablativen Therapie oder um unnötige Operationen zu verhindern, die medikamentöse Therapie im metastasierten Stadium bei unbekannter Histologie besser zu adjustieren oder Abszesse, Lymphome oder Metastasen anderer Tumore auszuschließen [153,292].

4.1.5. Staging

Beim Staging teilt man die Nierenzellkarzinome anhand der Tumorgöße, des Lymphknotenstatus und der Fernmetastasierung nach der TNM-Klassifikation der UICC ein [68]. Während bei den auf die Niere begrenzten Stadien T1 und T2 die Tumorgöße allein über das Stadium entscheidet, erfolgt die Einteilung in T3 oder T4 je nach Ausmaß der Infiltration ins umliegende Gewebe (wie z. B. in die Nierenvene oder Nebenniere) [227]. Das Tumorstadium hat dabei den größten Einfluss auf die Prognose beim Nierenzellkarzinom [22,279,299]. Neben dem Nutzen in der Prognoseabschätzung dient die Einteilung nach der TNM auch der Therapieplanung, dem standardisierten Informationsaustausch zwischen Therapiezentren und sie liefert Daten zur Tumorforschung [22].

T – Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumor 7 cm oder weniger in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere T1a Tumor 4 cm oder weniger in größter Ausdehnung T1b Tumor mehr als 4 cm, aber nicht mehr als 7cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 7 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere T2a Tumor mehr als 7 cm, aber nicht mehr als 10 cm in größter Ausdehnung T2b Tumor mehr als 10 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor breitet sich in größere Venen aus oder infiltriert direkt perirenales Gewebe, jedoch nicht in ipsilaterale Nebenniere und nicht über die Gerota-Faszie hinaus T3a Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in die Nierenvene oder ihre segmentalen Äste <i>oder</i> Tumor infiltriert das Nierenbeckenkelchsystem <i>oder</i> Tumor infiltriert die perirenalen und peripelvinen Fettgewebe, aber nicht über die Gerota-Faszie hinaus T3b Tumor mit Ausbreitung in die Vena cava unterhalb des Zwerchfells T3c Tumor mit Ausbreitung in die Vena cava oberhalb des Zwerchfells oder mit Infiltration der Wand der V. cava
T4	Tumor infiltriert über die Gerota-Faszie hinaus (eingeschlossen die kontinuierliche Ausbreitung in die ipsilaterale Nebenniere)
N – Regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in regionärem Lymphknoten
M – Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 1 TNM-Klassifikation Nierentumoren (ICD-O-3 C64)
entnommen aus [307]

Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Stadium IV	T4	Jedes N	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 2 Stadieneinteilung von Nierenzelltumoren entnommen aus [307]

4.1.6. Histopathologische Einteilung

Zusätzlich zu der morphologisch-basierten Einteilung der Nierentumore erhalten mit der Änderung der WHO-Klassifikation 2022 vermehrt auch molekulare Veränderungen Einzug in die Klassifikation [188]. Allen voran macht dabei das Nierenzellkarzinom beim Erwachsenen den größten Anteil der Tumore aus [194,299]. Es kann in histologische Subtypen unterteilt werden, von denen das klarzellige Nierenzellkarzinom mit einem Anteil von 70-90% die mit Abstand häufigste Entität darstellt [13,299]. Danach folgen an 2. und 3. Stelle das papilläre NZK mit 10-15% und das chromophobe NZK mit nur ca. 3-5% der Fälle [13,299]. Neben den drei häufigsten Formen der Nierenzelltumore existieren noch viele weitere, jedoch deutlich seltenere Entitäten, die der folgenden Tabelle 3 entnommen werden können.

Die klarzelligen und papillären NZK leiten sich von den Zellen des proximalen Tubulus ab und die chromophoben Tumore sowie die Onkozytome entstammen den distalen Tubuli [5,252]. Wie der Name der medullären und Sammelgang-Karzinome bereits nahelegt, entwickeln sich diese aus den Zellen des Nierenmarks und der Sammelrohre [252].

Nierenzelltumore
<i>Klarzellige Nierentumore</i> Klarzelliges Nierenzellkarzinom Multilokulärer zystischer Nierenzelltumor mit niedrig malignem Potential
<i>Papilläre Nierentumore</i> Papilläres Adenom Papilläres Nierenzellkarzinom
<i>Onkozytäre und chromophobe Nierentumore</i> Onkozytom Chromophobes Nierenzellkarzinom Andere onkozytäre Tumore der Niere
<i>Sammelgang-Tumore</i> Sammelgang-Karzinom
<i>Andere Nierentumore</i> Klarzelliger papillärer Nierenzelltumor Muzinöses tubulär und spindelzelliges Nierenzellkarzinom Tubulozystisches Nierenzellkarzinom Nierenzellkarzinom assoziiert mit einer erworbenen zystischen Nierenerkrankung Eosinophiles solid und zystisches Nierenzellkarzinom Nierenzellkarzinom, nicht weiter spezifiziert
<i>Molekular-definierte Nierenzellkarzinome</i> TFE3-rearrangierte Nierenzellkarzinome TFEB-veränderte Nierenzellkarzinome ELOC (ehemals TCEB1)-mutiertes Nierenzellkarzinom Fumarat-Hydratase-defizientes Nierenzellkarzinom Nierenzellkarzinom assoziiert mit hereditärer Leiomyomatose Succinat-Dehydrogenase-Defizienz-assoziiertes Nierenzellkarzinom ALK-rearrangiertes Nierenzellkarzinom Medulläres Karzinom, nicht weiter spezifiziert SMARCB1-defizientes medullär anmutendes Nierenzellkarzinom SMARCB1-defizientes undifferenziertes Nierenzellkarzinom, nicht weiter spezifiziert SMARCB1-defiziente entdifferenzierte Nierenzellkarzinome anderer spezifischer Subtypen

Tabelle 3 WHO-Klassifikation der Nierenzelltumore 2022
(modifiziert aus [304], zitiert nach [188], durch Bearbeiterin ins Deutsche übersetzt)

4.1.6.1. Klarzellige Nierenzellkarzinome

Dieser häufigste Subtyp des NZK präsentiert sich makroskopisch meist als gut umschriebener gelblicher Tumor, der oftmals auch Einblutungen, Nekrosen, Zysten und Verkalkungen aufweist [63,252]. Namensgebend sind die lipid- und glykogenreichen Tumorzellen, die mikroskopisch mit einem „klaren“ bzw. hellen Zytoplasma imponieren [252]. Dieser Tumortyp ist klassischerweise sehr gut vaskularisiert und neigt insbesondere mit zunehmender Größe

zur Infiltration in Nachbarstrukturen [252]. Histologisch findet sich neben soliden, alveolären und azinösen Anteilen ein Netz aus kleinen, dünnwandigen Gefäßen [63]. Beim klarzelligen NZK finden sich oft Veränderungen und Mutationen beim VHL-Gen (siehe Unterpunkt 4.1.2), aber auch bei Genen der Chromatin-Remodellierung oder Histonmodifizierung wie z. B. PBRM1, SETD2, BAP1 sowie KDM5C [97,111,252]. Neben der Deletion von Chromosom 3p zählen zu den häufigsten chromosomalen Veränderungen im klarzelligen NZK auch die Deletionen der Chromosomen 14q, 8p, 9p und 18q, aber auch Zugewinne an Chromosomen, wie bspw. Chromosom 5q oder 7q [73,232].

4.1.7. Grading

Zusätzlich zur Bestimmung des Tumorstadiums und des -typs ist es notwendig, die Nierenzellkarzinome zu graduieren, also den Differenzierungsgrad zu untersuchen, da diese drei Parameter die einzigen etablierten Prognoseparameter beim Nierenzellkarzinom darstellen [186]. Dies erlaubt eine weitere Einteilung innerhalb der einzelnen Tumorstadien und eine differenziertere Prognoseeinschätzung [186]. Beim Grading hat das WHO-ISUP-Graduierungssystem 2016 das jahrelang verwendete Fuhrman-Grading abgelöst [186]. Beim WHO-ISUP-Grading 2016 werden die Tumore in 4 Grade eingeteilt [53,187]. Für Grad 1-3 geschieht dies einzig und allein anhand der Prominenz der Nukleoli [53,186,187]. Bei Grad 4 liegt eine sarkomatoide oder rhabdoide Differenzierung sowie mehrkernige Riesenzellen oder eine extreme Kernpleomorphie vor [53,186,187].

Dieses Gradingssystem kann nur an klarzelligen und papillären Nierenzellkarzinomen, nicht aber an chromophoben NZK angewandt werden [53].

Neben dem Grading sollte auch der prozentuale Anteil an Nekrosen bestimmt und dokumentiert werden [153].

4.1.8. Prognosefaktoren und Prognosebewertung

4.1.8.1. Relative 5-Jahres-Überlebensrate

Laut Angabe des Krebsregisters München lag die 5-Jahres-Überlebensrate für die TNM-Kategorie T1M0 in den Jahren 1998-2020 bei 98,9%. Mit steigender T-Kategorie, aber fehlender Fernmetastasen lag die relative 5-Jahres-Überlebensrate in diesem Zeitraum für T3M0 immer noch bei 76,1%. Mit dem Auftreten von Lymphknoten- (N1) oder Fernmetastasen (M1) sank jedoch die relative 5-Jahres-Überlebensrate auf nur noch 42,3% (N1) bzw. 18,0% (M1) [280]. Die Prognose verschlechtert sich demnach mit steigender T-Kategorie sowie dem Vorliegen von Fern- oder Lymphknotenmetastasen maßgeblich [291].

4.1.8.2. Prognosefaktoren

Prognosefaktoren lassen sich in 4 Kategorien unterteilen: anatomische, histologische, klinische und molekulare Prognosefaktoren [139,291].

Die Einteilung nach der TNM-Klassifikation stellt hierbei den anatomischen Prognosefaktor dar [139]. Neben der Prognoseverschlechterung durch den Anstieg des TNM-Stadiums spielt

hierbei im metastasierten Stadium auch die Anzahl und die Lage der Fernmetastasen eine Rolle [139]. Zu den histologischen Faktoren zählen das Grading, der histologische Subtyp, Nekrosen, eine sarkomatoide oder rhabdoide Differenzierung sowie die mikrovaskuläre Infiltration [139]. Neben diesen Faktoren gibt es noch klinische Parameter wie den Performance Status, vorhandene oder fehlende Symptome zum Diagnosezeitpunkt, paraneoplastische Symptome sowie verschiedene Laborparameter, die zur prognostischen Einschätzung herangezogen werden können [139,261]. Zu den molekularen Markern, die in Bezug auf die Prognose beim NZK erforscht werden, zählen neben verschiedenen Mutationen und epigenetischen Veränderungen unter anderem auch die Carboanhydrase IX, Ki-67, p53, PD-L1, CD8 und viele weitere [139]. Sowohl die S3-Leitlinie [153] als auch die EAU empfehlen jedoch bisher die Anwendung dieser molekularen Marker noch nicht in der klinischen Routine [62,139].

4.1.8.3. Prognosemodelle

Da die Prognose des Nierenzellkarzinoms nur bedingt anhand einzelner Faktoren abschätzbar ist, existiert eine Vielzahl an Prognosemodellen, die verschiedene Kombinationen von Prognosefaktoren beinhalten und dadurch eine genauere Abschätzung erlauben [139,291]. Die Modelle unterscheiden sich auch in ihrer Anwendbarkeit vor oder nach Nephrektomie [261]. Zu den postoperativen Modellen, die vor allem bei Patient*innen im nicht-metastasierten Stadium Anwendung finden, zählen u. a. das UCLA Integrated Staging System (UISS) [339], der SSIGN-Score [72] und ein Nomogramm von Karakiewicz et al. [132,261]. Im metastasierten Stadium kann auf die Prognosemodelle des Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre (MSKCC) 2002 [196] und des International Metastatic Renal Cancer Database Consortium (IMDC) [103] zurückgegriffen werden [139]. Da die Wahl der Systemtherapie im metastasierten Stadium auf den IMDC-Kriterien beruht [153], wird nur dieses Modell hier näher beschrieben.

Das IMDC-Prognosemodell nach Heng et. al beinhaltet zwei klinische Parameter und vier Laborwerte [103]. Dazu zählen ein Karnofsky Performance Status <80%, eine Anämie (Hämoglobinwerte unterhalb der Norm), eine Hyperkalzämie, ein kurzer Zeitraum zwischen Diagnose und Therapie (weniger als 12 Monate) sowie eine Neutrophilie und eine Thrombozytose [103]. Je nach Anzahl der vorliegenden Risikofaktoren können die Patient*innen in 3 Prognosegruppen unterteilt werden. 0 Risikofaktoren entsprechen dabei der guten, 1-2 der intermediären und 3 oder mehr als 3 Risikofaktoren der schlechten Prognosegruppe [103].

4.1.9. Therapie

4.1.9.1. Lokal begrenzte/ nicht metastasierte Tumore

Gemäß den Empfehlungen der aktuellen S3-Leitlinie zum Nierenzellkarzinom ist im nicht-metastasierten Stadium die kurativ-intendierte chirurgische Therapie die Therapie der Wahl

[153]. Den Standard soll hierbei die organerhaltende Nierenteilresektion für die klinische Kategorie T1, aber wenn möglich auch für lokal begrenzte Tumore einer höheren T-Kategorie, darstellen [153]. Die Entscheidung darüber, ob ein offenes, laparoskopisches oder robotisch-assistiertes Verfahren hierbei zur Anwendung kommt, soll sich nach der Erfahrung des Operateurs richten [153].

Um im Rahmen der Operation eines Nierenzellkarzinoms den Verlust der Nierenfunktion und eine Dialysepflichtigkeit zu vermeiden, zählen zu den imperativen Indikationen für eine Nierenteilresektion das Vorliegen einer anatomischen oder funktionellen Einzelniere, bilaterale Nierentumore, hereditäre Tumorsyndrome, chronisches Nierenversagen sowie Erkrankungen, bei denen eine Gefahr besteht, niereninsuffizient zu werden, wie z. B. Diabetes mellitus oder eine Nierenarterienstenose [144].

Für den Fall, dass ein organerhaltender Ansatz nicht möglich ist, soll eine radikale Nephrektomie erfolgen, wobei hierbei eine minimal-invasive Technik der offenen Operation vorzuziehen ist [153].

Stellt sich intraoperativ oder in der Bildgebung eine Vergrößerung der Lymphknoten heraus, so können diese entnommen werden [153]. Ohne eine Auffälligkeit soll jedoch keine Lymphadenektomie erfolgen [153]. Ebenso soll bei der ipsilateralen Nebenniere vorgegangen werden [153].

Neben dem chirurgischen Therapieansatz gibt es für kleine Nierentumore (engl.: small renal mass), die kleiner oder gleich 4 cm sind und eine Kontrastmittelanreicherung in der abdominellen Bildgebung zeigen [77], auch ablative Therapien, bei denen Kälte oder Radiofrequenz zum Einsatz kommen [36]. Diese Form der Behandlung ist in der Leitlinie jedoch nur Patient*innen vorbehalten, die entweder schwere Komorbiditäten oder eine begrenzte Lebenserwartung oder beides aufweisen [153]. Anstelle der chirurgischen oder ablativen Therapie können diese Patient*innen aber auch der Active Surveillance zugeführt werden [153]. Bei der Active Surveillance (aktiven Überwachung) wird der Tumor mittels Bildgebung überwacht und erst bei einer Größenprogression therapeutisch interveniert [290]. Sowohl vor der Ablation als auch vor der Active Surveillance soll laut S3-Leitlinie eine Biopsie erfolgen [153].

Die neoadjuvante Therapie beim nicht-metastasierten NZK soll nicht bzw. nur im Rahmen von Studien erfolgen. Während die aktuelle Leitlinie (November 2021) derzeit zwar adjuvant weder eine Immuntherapie noch eine Vakzinierungstherapie empfiehlt und auch Target-Therapien nur in Studien erprobt werden, konnte in der Studie KEYNOTE-564 für Patient*innen mit hohem Risiko für das Wiederauftreten der Erkrankung nach Nephrektomie ein Vorteil der adjuvanten Gabe von Pembrolizumab gegenüber dem Placebo in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben („disease free survival“) gefunden werden [41,153].

4.1.9.2. Fortgeschrittene/ Metastasierte Nierenzellkarzinome

Den Angaben des Robert-Koch-Instituts zufolge beläuft sich der Anteil der Patient*innen, die sich bei Erstdiagnose bereits im UICC-Stadium IV befinden auf 16-18% [229]. Liegen die Metastasen bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose vor, spricht man von einer synchronen Metastasierung [57]. Im Verlauf der Erkrankung entwickeln bis zu 20% der zum Zeitpunkt der Nephrektomie nicht-metastasierten Patient*innen Fernmetastasen, was man als metachron metastasiert bezeichnet [57]. Die Ausbreitung erfolgt dabei sowohl hämatogen als auch lymphogen [139]. Unter den häufigsten Metastasierungsorten belegt die Lunge mit ca. 45% den ersten Platz, gefolgt von den Knochen (ca. 30%), den Lymphknoten (ca. 22%), der Leber (ca. 20%), den Nebennieren (ca. 9%) und dem Gehirn (ca. 8%) [18]. Unter allen Patient*innen mit Nierenzellkarzinomen weisen jene im metastasierten Stadium die schlechteste Prognose auf (siehe hierzu Unterpunkt 4.1.8.1 Relative 5-Jahres-Überlebensrate). Ein kurativer Ansatz ist bei einzelnen Metastasen oder einer Oligometastasierung nur dann möglich, wenn sowohl der Primarius als auch die Metastasen vollständig operativ entfernt werden können, was nur bei sehr wenigen Patient*innen der Fall ist [162]. Bei den anderen Patient*innen stellt die zytoreduktive Nephrektomie, die im Falle einer synchronen Metastasierung und eines guten Performance Status (ECOG 0-1) erfolgen soll [153], nur noch einen palliativen Ansatz dar und eine systemische Therapie ist erforderlich [62]. Die S3-Leitlinie empfiehlt bei einer solitären metachronen Metastase diese lokal zu therapieren und bei einer Oligometastasierung innerhalb eines Organsystems, sofern eine komplette Resektion nicht möglich oder der Patient inoperabel ist, auf radiotherapeutische Verfahren (Radiochirurgie, stereotaktische Bestrahlung etc.) zurückzugreifen [153]. Bezüglich der Systemtherapie ergibt sich beim Nierenzellkarzinom die Besonderheit, dass es resistent gegen Chemotherapie ist und deshalb andere therapeutische Wege eingeschlagen werden müssen [178,195]. Als ursächlich für die Resistenz gegen Chemotherapeutika wird die hohe Expression des MDR-1-Genprodukts P-Glykoprotein angesehen, das die Medikamente aktiv aus den Zellen befördert [69,156].

Zytokine wie Interferon-alpha oder IL-2 wurden in der Vergangenheit mit nur mäßigem Erfolg, dafür aber starken Nebenwirkungen angewendet [39] und sollen den Empfehlungen der aktuellen Leitlinie folgend nicht mehr alleine eingesetzt werden [153].

Die Therapie im metastasierten Stadium richtet sich nach den IMDC-Prognosegruppen (günstig, intermediär, schlecht) und individuellen Faktoren, wie z. B. Komorbiditäten und erfolgt als Sequenztherapie, sodass bei Versagen einer Therapie eine Alternative angeboten wird [153]. Bestehen Symptome oder ein ungünstiges Risiko, so soll die Therapie direkt begonnen werden. Ist dies nicht der Fall, so kann bis zum Progress gewartet werden [153]. Zur Verfügung stehen zur Systemtherapie Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI), wie Sunitinib, Tivozanib, Sorafenib, Pazopanib, Lenvatinib, Axitinib und Cabozantinib, mTOR-Inhibitoren wie Everolimus und Temsirolimus, VEGF-Antikörper wie Bevacizumab und Immuncheckpointinhibitoren wie

Avelumab (PD-L1-Inhibitor), Pembrolizumab (PD-1-Inhibitor), Nivolumab (PD-1-Inhibitor) und Ipilimumab (CTLA-4-Inhibitor) [153]. Die Erstlinientherapie basiert auf der Checkpointinhibitorkombinationstherapie und besteht i.d.R. aus der Kombination eines Checkpointinhibitors mit einem Tyrosinkinaseinhibitor, wobei für alle Risikogruppen die Kombination aus Pembrolizumab und Axitinib mit dem Empfehlungsgrad A und die Kombination aus Avelumab und Axitinib mit Empfehlungsgrad B vorgeschlagen werden [153]. Ebenfalls stark empfohlen ist bei intermediärem oder ungünstigem Risiko die Kombination aus Ipilimumab und Nivolumab [153]. Ist die Kombinationstherapie mit Checkpointinhibitoren nicht möglich, so empfiehlt die Leitlinie die Gabe von den Tyrosinkinaseinhibitoren Tivozanib, Sunitinib und Pazopanib oder alternativ Bevacizumab plus Interferon bei günstigem Risiko [153]. Beim intermediären Risiko soll Pazopanib, Tivozanib, Sunitinib oder Cabozantinib gegeben werden und beim ungünstigen Risiko Cabozantinib oder Sunitinib [153]. Laut Leitlinie kann beim intermediären Risiko die Gabe von Bevacizumab und Interferon und beim ungünstigen Risiko die Gabe von Pazopanib oder Temsirolimus erfolgen [153]. Versagt die Erstlinientherapie, so wird in der Zweit- bzw. Drittlinie auf eine Substanz gesetzt, die vorher noch nicht zur Anwendung kam [153]. Nach Versagen der alleinigen VEGFR-Therapie sollen Cabozantinib oder Nivolumab zur Anwendung kommen [153]. Alternativ sollte auf Lenvatinib und Everolimus umgestiegen werden [153]. Bei Versagen der Checkpointinhibitortherapie wird auf einen TKI gewechselt und bei Versagen eines mTOR-Inhibitors auf Nivolumab oder einen TKI [153].

4.2. Grundlagen zu Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI)

Nach jahrelangen Therapieversuchen mit einer unspezifischen Immuntherapie mit Zytokinen wie Interferon- α und IL-2 wurden in den frühen 2000er Jahren die ersten Tyrosinkinaseinhibitoren von der FDA zugelassen [92]. Die Erkenntnis der engen Verbindung des klarzelliges Nierenzellkarzinoms zu Veränderungen im VHL-Signalweg führte zu dieser Änderung der Therapie und zur Entwicklung neuer antiangiogenetischer Substanzen [39,233].

4.2.1. Molekulare Grundlagen

Als Folge der Veränderungen im VHL-Signalweg kommt es, wie bereits unter Punkt 4.1.2 beschrieben, zur Anhäufung der Transkriptionsfaktoren HIF1 α und HIF2 α , was wiederum eine Kumulation proangiogenetischer und wachstums- sowie tumorfördernder Faktoren wie VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), EPO (Erythropoetin), TGF- α (transforming growth factor- α), GLUT1 und CXCR4 auslöst [158,277]. Das Nierenzellkarzinom weist dabei die stärkste VEGF-Produktion unter den epithelialen Tumoren auf und zeigt eine gesteigerte Angiogenese, die eine wichtige Rolle in der Tumorprogression einnimmt [86,248]. VEGF stimuliert die Proliferation und Migration der Endothelzellen und umfasst VEGF-A, -B, -C, -D und den PlGF (placental growth factor), wobei vor allem VEGF-A die Angiogenese antreibt [80,86]. Die entsprechenden Rezeptoren sind die

zu den Tyrosinkinase zählenden VEGF-Rezeptoren (VEGFR), die wiederum in 3 Rezeptortypen (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3) unterteilt werden können, wobei die Angiogenese vor allem von VEGF-A über VEGFR-2 vermittelt wird [86,134]. Während VEGFR-1 und -2 vor allem auf Endothelzellen anzutreffen sind, befinden sich die VEGFR-3 hauptsächlich auf lymphatischen Gefäßen [201].

Die VEGF-Rezeptoren befinden sich neben den Endothelzellen jedoch auch auf Tumorzellen, sodass es durch die VEGF-Produktion neben der Steigerung der Angiogenese auch zu einer autokrinen Aktivierung der Rezeptoren auf der Tumorzelle selbst kommen kann, wodurch auch direkt das Überleben, die Migration, das Wachstum und die Invasion der Tumorzellen gefördert wird [29,65,105]. Daneben supprimiert VEGF außerdem das Immunsystem, indem beispielsweise die T-Zellen gehemmt, regulatorische T-Zellen und myeloide Suppressorzellen (MDSC) vermehrt rekrutiert und dendritische Zellen in der Differenzierung und Aktivierung inhibiert werden [316].

Neben VEGF kommt es durch den Verlust des VHL-Gens auch zur vermehrten Aktivierung des Rezeptors MET durch seinen Liganden HGF (hepatocyte growth factor), wodurch eine Abhängigkeit von MET entsteht, die therapeutisch durch den Einsatz von Cabozantinib genutzt wird, da dieses Medikament neben VEGFR und anderen Rezeptoren auch AXL und MET blockiert [21,40].

4.2.2. Allgemeines Wirkprinzip

Die Tyrosinkinase lassen sich in Rezeptortyrosinkinase (RTK) und nicht-Rezeptortyrosinkinase unterteilen [145]. Die RTKs bestehen aus einer extrazellulären Bindestelle, einer transmembranären Helix sowie einem intrazellulären Teil, der sich aus einem Tyrosinkinasekern, einer juxtamembranären Region und regulatorischen Einheiten zusammensetzt [205].

Die Aufgabe einer Kinase besteht in der Übertragung eines Phosphats (z. B. von ATP) auf ein Substrat [86]. Bindet nun ein Ligand an den Tyrosinkinase-Rezeptor, so dimerisiert der ursprünglich monomere Rezeptor (mit der Ausnahme des Insulinrezeptors) und die Tyrosinreste der zytoplasmatischen Kinaseanteile werden autophosphoryliert [86,235]. Neben der Autophosphorylierung der katalytischen Bereiche und die dadurch erfolgende Aktivierung der Kinase werden auch nicht-katalytische Regionen autophosphoryliert, sodass Bindestellen für weitere Moleküle entstehen [205]. Dies bedingt im Gegenzug wiederum die Rekrutierung und Aktivierung anderer Signalmoleküle, die an die Phosphotyrosinreste binden und dadurch weitere nachgeschaltete Signalwege in Gang setzen [60].

In diesem Zusammenhang ergeben sich zwei unterschiedliche Angriffspunkte im VEGF-Signalweg [99]. Einerseits kann die Bindung zwischen VEGF und VEGFR gehemmt werden, z. B. durch Antikörper, die entweder VEGF abfangen oder den Rezeptor blockieren [99]. Andererseits kann die intrazelluläre ATP-Bindestelle der Tyrosinkinase kompetitiv blockiert

werden, sodass ATP nicht binden kann und die nachgeschalteten Signalwege inaktiv bleiben [99]. Dies ist der Hauptmechanismus der Tyrosinkinaseinhibitoren [99].

Ermöglicht wird die intrazelluläre Wirkung der Tyrosinkinaseinhibitoren dadurch, dass es sich dabei um kleine Moleküle („small molecular drugs“) handelt, die im Gegensatz zu Antikörpern ins Zellinnere gelangen [86,117].

Normalerweise bindet ATP mit seinem Adeninring seine intrazelluläre Bindungsstelle mittels Wasserstoffbrückenbindungen [327]. Die Tyrosinkinaseinhibitoren lassen sich bezüglich der Inhibition dieser Bindung in 4 Typen unterscheiden [327].

Typ 1 zielt auf die aktive Konformation der Kinase ab und ist die häufigste Form der ATP-kompetitiven TKIs, die die Bindung des ATPs über Wasserstoffbrückenbindungen in der ATP-Bindungsstelle der Kinase imitieren [327].

Typ 2 greift die inaktive Konformation der Kinase an, Typ 3 inhibiert über eine allosterische Bindung außerhalb der ATP-Bindestelle, sodass dieser Typ eine höhere Selektivität für die jeweilige Kinase aufweist und Typ 4 bindet kovalent und irreversibel [327].

4.2.3. Pazopanib

Pazopanib ist ein oral einzunehmender, ATP-kompetitiver Multityrosinkinaseinhibitor, der neben der Blockade von VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 auch PDGFR- α , PDGFR- β und c-KIT hemmt und einen moderaten Effekt auf FGFR1, FGFR3 und c-fms aufweist [147]. Pazopanib ist seit 2009 von der FDA [32] und seit 2010 von der EMA zur Behandlung von fortgeschrittenen Nierenzellkarzinomen und mittlerweile auch zur Behandlung von Weichteilsarkomen zugelassen [66].

In der Phase III Studie VEG105192 von Sternberg et al. wiesen die Patient*innen im Pazopanibarm gegenüber jenen im Placeboarm eine bessere Ansprechrate (engl. response rate (RR)) sowie ein längeres progressionsfreies Überleben (PFS) auf [260]. Eingeschlossen wurden in diese Studie nur Patient*innen mit fortgeschrittenem oder metastasiertem Nierenzellkarzinom, die entweder therapienaiv oder bereits mit Zytokinen vorbehandelt waren und ein klarzelliges oder überwiegend klarzelliges Nierenzellkarzinom aufwiesen [260]. Häufig beobachtet wurden unter der Pazopanibbehandlung als unerwünschte Arzneimittelwirkungen Diarrhö, Bluthochdruck, Veränderungen der Haarfarbe, Übelkeit, Gewichtsverlust und Erbrechen, die jedoch in den meisten Fällen als Grad 1 oder 2 Nebenwirkung auftraten [260]. Schwerere Nebenwirkungen (Grad 3 und 4) beliefen sich vor allem auf Hypertonie und Diarrhö und traten insgesamt seltener auf [260]. Bei den Laborwerten wurden am häufigsten Veränderungen der AST und ALT beobachtet [260].

Im direkten Vergleich zu Sunitinib in der COMPARZ-Studie, bei zuvor unbehandelten Patient*innen mit fortgeschrittenem oder metastasiertem klarzelligem NZK, konnte Pazopanib seine Nicht-Unterlegenheit in Bezug auf das PFS und das Gesamtüberleben (engl.: overall survival (OS)) beweisen [197]. Auch in dieser Studie traten als unerwünschte

Arzneimittelwirkungen Diarrhö, Fatigue, Hypertonie und Übelkeit auf, wobei unter Sunitinib die Rate an Patient*innen mit Hand-Fuß-Syndrom, mukosaler Entzündung, Dysgeusie, Dyspepsie, Fatigue, Epistaxis und Hypothyreoidismus signifikant höher waren als unter Pazopanib [197]. Dem gegenübergestellt traten unter Pazopanib signifikant häufiger Alopezien, Gewichtsverluste, Haarfarbenveränderungen sowie Laborveränderungen, wie die Erhöhung der ALT, der AST und des Bilirubins auf [197].

Der Frage nachgehend, welches Medikament von Patient*innen und Therapeut*innen bevorzugt wird und aus welchen Gründen dies geschieht, erfolgte die PISCES-Studie von Escudier et al., in der die Betroffenen sowohl mit Pazopanib als auch mit Sunitinib behandelt wurden [67]. Hierbei stellte sich heraus, dass 70% der Patient*innen Pazopanib gegenüber Sunitinib aufgrund einer besseren Lebensqualität und geringerer Fatiguesymptomatik bevorzugten, wohingegen nur 22% Sunitinib mit der Begründung von seltener auftretender Diarrhö favorisierten und 8% keine Präferenz angaben [67]. Auch unter den Therapeut*innen konnte eine klare Bevorzugung des Pazopanibs gesehen werden [67].

4.2.4. Resistenzentwicklung

Die Resistenzentwicklung gegen systemische Therapien stellt eine große therapeutische Herausforderung dar, da insbesondere bei fortgeschrittenen Tumoren eine Kuration selten erreicht, aber dafür das Auftreten von Resistenzen häufiger beobachtet wird und in diesem Zusammenhang ein Großteil der Todesfälle der Resistenzentwicklung zugeschrieben werden [281].

Während die primäre (auch intrinsisch genannte) Resistenz bereits vor Therapiebeginn besteht, entwickelt sich die sogenannte sekundäre (oder auch erworbene) Resistenz erst im Verlauf einer Therapie nach initialem Ansprechen [174].

Gegenüber Pazopanib zeigten in der Phase III Studie von Sternberg et al. 18% der Patient*innen eine Tumorprogression als beste Antwort, was dem Anteil der intrinsisch resistenten Patient*innen entspricht [260]. Die mediane Dauer des Ansprechens auf Pazopanib lag bei 58,7 Wochen also in etwa 15 Monaten, nach denen eine sekundäre Resistenz auftrat [260].

4.2.4.1. Primäre Resistenz

Der primären Resistenz liegen verschiedene Mechanismen zugrunde. 2008 fanden Gordan et al. heraus, dass sowohl der Mutationsstatus des VHL-Gens als auch die HIF-1 α - und die HIF-2 α -Expression sich unterschiedlich auf das Resistenzverhalten der Tumore auswirken [83]. Demnach lassen sich die Patient*innen in 3 Gruppen einteilen, wobei jene mit pVHL-Defizienz, die nur HIF-2 α exprimierten, eine gesteigerte c-Myc-Aktivität und damit vermehrte Proliferation und Resistenz aufwiesen, während die anderen beiden Gruppen (zum einen mit VHL-Wildtyp und zum anderen mit pVHL-Defizienz, aber HIF-1 α - und HIF-2 α -Expression) eher auf die Therapie ansprachen [83].

Weitere Faktoren, die zur primären Resistenz beitragen, sind das Vorliegen redundanter proangiogenetischer Faktoren [16,224], die therapieunabhängige Infiltration mit Entzündungszellen (wie z. B. CD11b⁺Gr1⁺ myeloische Zellen) [251], aber auch die Inhibition der Apoptose durch die vermehrte Expression von Bcl-2/ Bcl-X_L [79] oder die unzureichende Aktivierung der Apoptose über CD95 im Nierenzellkarzinom [61,219].

4.2.4.2. Sekundäre Resistenz

Kamli et al. beschreiben 5 unterschiedliche Mechanismen, über die eine erworbene Resistenz gegen Therapien, die in den VEGF-Signalweg eingreifen, entstehen kann [130]. Dazu zählen die Förderung der Angiogenese über die Hoch- oder Runterregulation von Genen alternativer angiogenetischer Signalwege, die Anhäufung und vermehrte Aktivität von Perizyten im Bereich der Tumorgefäße, die Rekrutierung angiogenesefördernder inflammatorischer Zellen aus dem Knochenmark, die lysosomale Sequestrierung des Medikaments sowie die gesteigerte Fähigkeit zur Invasion über die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) [130]. Sharma et al. nennen zusätzlich noch miRNAs und Einzelnukleotidpolymorphismen (engl.: single nucleotide polymorphism (SNP)) als weitere Mechanismen [243].

4.3. Grundlagen zu Extrazellulären Vesikeln (EV)

Extrazelluläre Vesikel werden sowohl von Eukaryonten als auch Prokaryonten gebildet und präsentieren sich als kugelförmige Partikel, die von einer Phospholipiddoppelschicht umgeben sind [209]. Exosomen gehören zur Gruppe der extrazellulären Vesikel und weisen je nach betrachteter Literatur eine Größe zwischen 30 nm bis 100 nm [14] bzw. bis 150 nm [123,127] auf. Neben den Exosomen zählen zu dieser Vesikelgruppe noch die Mikrovesikel mit einer Größe zwischen 50 und 2.000 nm, die durch direkte Membranknospung entstehen, sowie die apoptotischen Körper, die im Rahmen des programmierten Zelltodes auftreten und sich in einem Bereich von 50-5.000 nm bewegen, sodass sich diese beiden Vesikeltypen von den Exosomen anhand ihrer Größe und Biogenese abgrenzen lassen [104,127].

Extrazelluläre Vesikel, deren Ausschüttung einen evolutionär hochkonservierten Vorgang darstellt, werden in sämtlichen Körperflüssigkeiten gefunden [94,303]. Dementsprechend sind u. a. die Exosomen von Tumoren in den letzten Jahren immer weiter ins Interesse der Forschung gerückt, da sie neue Ansatzpunkte sowohl als Biomarker zur Diagnose-, Prognose- und Progressionseinschätzung (im Rahmen der „liquid biopsy“) als auch als therapeutische Targets bieten [191,324].

4.3.1. Biogenese der Exosomen

Die Bildung der Exosomen erfolgt im Gegensatz zu der Biogenese der Mikrovesikel über den endosomalen Weg (siehe hierzu Abbildung 1) [1]. Die Endosomen kann man in die frühen, späten und Recycling-Endosomen unterteilen [1]. Diese frühen Endosomen fusionieren mit endozytotischen Vesikeln und sortieren deren Inhalt je nachdem, ob dieser recycelt, abgebaut oder sezerniert werden soll [1]. Über verschiedene Zwischenschritte entstehen dabei aus den

frühen Endosomen die späten Endosomen, wobei die Inhalte, die entweder abgebaut oder sezerniert werden sollen, hierbei in sogenannte intraluminale Vesikel (ILV) durch die Invagination der endosomalen Membran verpackt werden, wodurch der Multivesicular Body (MVB) entsteht [1]. Im Anschluss fusioniert der MVB entweder mit den Lysosomen, sodass dessen Fracht abgebaut wird oder mit der Zellmembran, wodurch es zur Freisetzung der intraluminalen Vesikel kommt, die ab diesem Zeitpunkt als Exosomen bezeichnet werden [1,94].

Im Zusammenhang mit der MVB-Bildung und der Sortierung der Inhalte der ILV spielen die sogenannten ESCRT-Proteine-0, -I, -II und III (engl.: endosomal sorting complex required for transport) eine wichtige Rolle [34,183].

Die Biogenese der Exosomen kann sowohl ESCRT-abhängig als auch -unabhängig ablaufen, wobei bei dem unabhängigen Weg u. a. das Sphingolipid Ceramid involviert ist [34,278]. Daneben sind auch Tetraspanine wie z. B. CD63, CD81, CD82, CD9 [284,285] sowie die ESCRT-assoziierten Proteine Alix und TSG-101 Teil des Entstehungsweges oder der Beladung der Exosomen, was u. a. ihren Einsatz als Exosomenmarker erklärt, da sie häufig bei extrazellulären Vesikeln gefunden werden [1,325].

Unter Umständen, die zu vermehrtem Zellstress führen, wie bspw. Hypoxie oder Bestrahlung, wurde eine gesteigerte Exosomenproduktion festgestellt [104,138,151]. Ebenso schütten Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen mehr Exosomen aus [95,164,217].

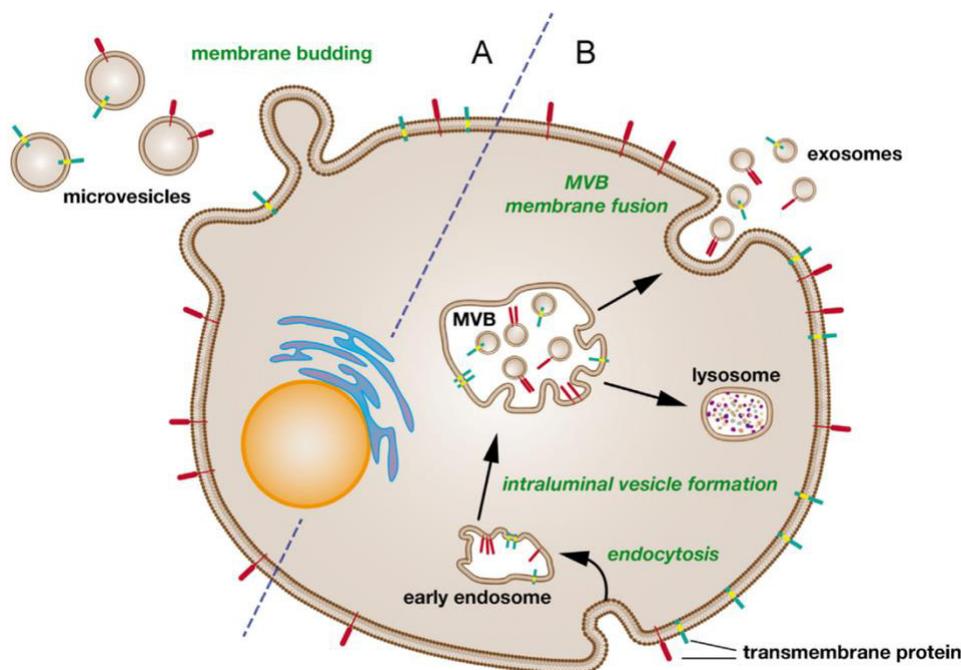


Abbildung 1 Bildung und Freisetzung der extrazellulären Vesikel (EVs)

EVs entstehen durch unterschiedliche Mechanismen. (A) Freisetzung der Mikrovesikel durch direkte Membranausknospung; (B) Bildung der Exosomen durch die Einstülpung der späten endozytotischen intraluminalen Vesikel, die als Multivesicular Bodies (MVBs) bezeichnet werden. Durch die Fusion des MVB mit der Plasmamembran werden die Exosomen in den extrazellulären Raum freigesetzt. Entnommen aus [127]; Übersetzung der Bildunterschrift durch Bearbeiterin

4.3.2. Inhalt der Exosomen

Zu den Inhalten der Exosomen zählen verschiedene Proteine wie Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Enzyme, Proteine der extrazellulären Matrix, Lipide und Nukleinsäuren, wobei die Zusammensetzung der Vesikel neben der Ursprungszelle auch den Entstehungsweg der Exosomen widerspiegelt [177]. Während manche Proteine in vielen Exosomen gefunden werden können, wie z. B. Rab2, Rab7, Flotillin, Annexin, Hsc70, Hsc90, Actin, Myosin, Tubulin, etc., gibt es auch viele Zelltyp-spezifische Proteine wie bspw. MHC-Moleküle, Integrine oder CAMs [177]. Bedingt durch die endosomale Entstehung finden sich in der exosomalen Membran endosomale Transport- und Fusionsproteine wie Flotillin, Annexin und GTPasen, bestimmte Lipide wie Ceramid, Sphingomyelin und Cholesterol, typische Tetraspanine wie CD9, CD63, CD37, CD81 und CD82 sowie Alix und TSG-101 [3,24]. Zu den transportierten Nukleinsäuren zählen DNA, mRNA und nicht-kodierende RNA, worunter miRNA, rRNA, tRNA, snRNA, small nucleolar RNA, lncRNA und piwiRNA fallen [95].

4.3.3. Funktionen der Exosomen

Obwohl ursprünglich davon ausgegangen wurde, dass Exosomen hauptsächlich Zellabfall transportieren [104], ist mittlerweile bekannt, dass diese Vesikel neben dem Abtransport von Abfallprodukten eine wichtige Rolle in der Zell-Zellkommunikation einnehmen und sowohl physiologische als auch pathologische Prozesse beeinflussen [303,314,324]. Über die Vesikel ist die Zellkommunikation sowohl im nahen Umfeld als auch auf Distanz möglich [94].

Exosomen sind in eine Vielzahl von Prozessen involviert, darunter unter anderem im Immunsystem [208,340], bei kardiovaskulären [122], metabolischen [91] und neurodegenerativen Erkrankungen [109], bei infektiösen Erkrankungen [47,254], während der Schwangerschaft [54] sowie in Tumoren [128]. In Bezug auf das Thema dieser Dissertation ist vor allem die Rolle der Exosomen in Tumoren und hierbei insbesondere in der Resistenzübertragung gegen Therapeutika von besonderem Interesse.

4.3.3.1. Rolle der Exosomen in Tumoren

Die Exosomen beeinflussen Tumore auf verschiedenen Wegen. Sie können das Überleben der Ursprungszelle fördern, indem sie autokrin deren Rezeptoren stimulieren [218] oder sich zytoplasmatischer DNA entledigen, die andernfalls zur Apoptose oder zum Zellzyklusarrest führen würde [267,328]. Parakrin können die Vesikel ebenfalls Rezeptoren aktivieren oder die Expression der miRNA oder RNA der Zielzelle verändern, was zur Änderung des biologischen Phänotyps und von Signalwegen führen kann [328].

Die Relevanz der Exosomen in Tumoren wird unter anderem darin ersichtlich, dass sie in die Angiogenese, Migration, Invasion, Metastasierung sowie die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und in die Etablierung der prämetastatischen Nische involviert sind [177]. Außerdem können sich Tumore mit Hilfe der Exosomen vor dem Immunsystem schützen, indem sie einerseits zu Veränderungen der T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (NK)

führen und andererseits die Differenzierung der regulatorischen T-Lymphozyten fördern, die zur Immunsuppression beitragen [123,242,320]. Dendritische Zellen können durch Tumorexosomen zu einer vermehrten IL-6-Ausschüttung und dadurch erhöhten Invasivität von Tumoren beitragen [249]. Auch die Differenzierung des M2-Subtyps der Makrophagen, der die Invasion, Migration und EMT begünstigt, wird durch Exosomen beeinflusst [110,298]. Durch den Transport von PD-L1 über Exosomen kann zum einen das PD-L1 auf Tumorzellen übertragen, zum anderen aber auch die Aktivität der zytotoxischen T-Zellen blockiert werden, sodass sich der Tumor der Immunkontrolle entzieht [35,319].

Im Rahmen der Angiogenese konnten Zusammenhänge mit dem exosomalen Transport des NOTCH Liganden Delta-like 4 (DLL-4) [246], dem Tetraspanin 8 (TSPAN8) [199] und unter anderem auch E-Cadherin [270] hergestellt werden [328].

Unter der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) versteht man den Wandel von Epithelzellen zu motilen invasiven Mesenchymzellen, wobei es zum Verlust oder der Reduktion von Adhäsionsstrukturen wie Tight junctions, Integrinen oder Cadherinen, zum Verlust der Zellpolarität sowie zu Veränderungen des Zytoskeletts kommt [239,240,253]. Die Exosomen liefern im Zuge dieser Veränderungen Moleküle, die die EMT begünstigen (wie Notch-1, Matrixmetalloproteinasen (MMP), HIF α , ...), wobei unter hypoxischen Bedingungen eine vermehrte Anreicherung von weiteren Molekülen wie IL-6, TGF β , TNF α , PDGF und β -Catenin beobachtet wurde, da die Hypoxie sowohl die EMT als auch die Metastasierung fördert [220,266]. Für die Metastasierung und Invasion bedarf es außer der EMT u. a. auch der Degradation der extrazellulären Matrix, worin z. B. Matrixmetalloproteinasen (MMPs) (wie z. B. MMP2, MMP1, MMP14, MMP19), ADAM-10 und ADAMTS1 oder auch Hitzeschockproteine wie HSP90 α verwickelt sind, die exosomal transportiert werden [98,102,179,272]. Exosomale Integrine wiederum ermöglichen die Ansteuerung eines bestimmten Metastasierungsortes und sind damit an der Etablierung der prämetastatischen Nische beteiligt [108].

4.3.3.2. Rolle der Exosomen in der Resistenzübertragung

Neben den zahlreichen bereits genannten Aufgaben der Exosomen fungieren sie zudem auch als Vermittler der Resistenz gegen systemische Therapien [256,259]. Tumorzellen können die Medikamentenkonzentration durch die Absonderung von extrazellulären Vesikeln, die das Medikament enthalten, senken [245]. In diesem Zusammenhang spielen auch Effluxpumpen wie P-gp und ABCG2 eine wichtige Rolle [115,166,259]. Die Übertragung von P-gp von resistenten Zellen auf sensitive Zellen und die damit einhergehende Resistenzübertragung konnte in zahlreichen Studien nachgewiesen werden [46,166,256,276].

Aufgrund der Tatsache, dass Exosomen auch die Antigene ihrer Ursprungszellen transportieren, werden monoklonale Antikörper wie Trastuzumab (anti-HER2-Antikörper) oder Rituximab (anti-CD20-Antikörper) von den exosomalen Antigenen „abgefangen“, bevor sie an

die Zielantigene der Tumorzellen binden können, was dazu führt, dass ihre extrazelluläre Konzentration und damit auch ihre Wirkung sinkt [9,44].

Durch den Transport von Molekülen, die in Signalwege wie bspw. den PI3K/AKT-Signalweg involviert sind, kann die Viabilität gefördert und gleichzeitig die Apoptose gehemmt werden, sodass eine Resistenz entsteht, was u. a. bei der Übertragung von HGF im Zusammenhang mit der Sorafenibresistenz des hepatozellulären Karzinoms oder von PDGFR- β beim Melanom beobachtet wurde [168,216,287]. Neben der Hemmung der Apoptose kann auch die EMT exosomal vermittelt werden [163,297], was ebenfalls zur Resistenz führt.

Auch das Tumor Microenvironment (TME) mit den darin vorhandenen tumorassoziierten Fibroblasten („cancer associated fibroblasts“/CAF), tumorassoziierten Adipozyten („cancer associated adipocytes“/CAA), tumorassoziierten Makrophagen (TAM) oder auch Tumorstammzellen („cancer stem cells“/CSC) kann eine vermittelnde Funktion bei der exosomal Resistenzübertragung übernehmen, was u. a. im Pankreaskarzinom [19,225], im Magenkarzinom [332], im kolorektalen Karzinom [112] und im Ovarialkarzinom [8] gezeigt wurde [168].

Betrachtet man die Resistenzübertragung via Exosomen, so führt kein Weg an den nicht-kodierenden RNAs vorbei [93]. Für zahlreiche Tumorentitäten konnten exosomal transportierte miRNAs oder lncRNAs im Zusammenhang mit der Resistenzübertragung gefunden werden, darunter u. a. miR-222 bei der Adriamycin- und miR-221/222 bei der Tamoxifenresistenz des Mamma-Karzinoms [300,323], lncRNA SBF2-AS1 bei der Temozolomidresistenz des Glioblastoms [330], miR-155 bei der Gemcitabinresistenz des duktales Adenokarzinoms des Pankreas [182] oder auch miR-21 bei der Gefitinibresistenz des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms [125].

In Anbetracht der Tatsache, dass Pazopanib, sofern keine Immuncheckpointinhibitor-Kombinationstherapie möglich ist, neben anderen TKIs als Erstlinienmedikament beim fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom eingesetzt wird [153] und die Resistenzentwicklung ein großes therapeutisches Problem darstellt (siehe hierzu Punkt 4.2.4 mit den dazugehörigen Unterpunkten), drängt sich die Frage auf, ob auch die Pazopanibresistenz beim Nierenzellkarzinom über Exosomen übertragbar ist, wie es bereits für andere Entitäten gezeigt werden konnte (siehe oben). Durch die Untersuchung des zugrundeliegenden Pathomechanismus könnten sich neue Therapieansätze bei Patient*innen mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom ergeben, was sich auch prognostisch positiv auswirken könnte.

4.4. Zielsetzung/Fragestellung der Doktorarbeit

Ziel dieser Doktorarbeit ist die Überprüfung der Hypothese, dass die Resistenzinduktion in Nierenzellkarzinomen unter Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Pazopanib durch die Übertragung extrazellulärer Vesikel (Exosomen) möglich ist. Im Rahmen dieser Fragestellung ergeben sich mehrere Aufgabenstellungen.

Zunächst soll nachgewiesen werden, dass die verwendete Zelllinie Caki-2 Paz resistent gegen Pazopanib ist. Im Zuge dessen soll die IC50 sowohl der Wildtyp- als auch der resistenten Zellen bestimmt werden.

Um sicherzustellen, dass tatsächlich Exosomen isoliert wurden, soll mittels Western Blot eine Qualitäts- und Reinheitskontrolle der Exosomenisolation erfolgen. Zusätzlich wird als Nachweismethode für die Exosomen eine Messung der Partikel mittels Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) durchgeführt, um deren Größe und Konzentration zu bestimmen.

Im Weiteren soll die Aufnahme der Exosomen durch die Wildtypzellen mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen beurteilt werden.

Anschließend sollen dann die Effekte der Exosomen auf die Zellviabilität unter Pazopanibbehandlung mittels WST-1 beurteilt werden.

Diese Dissertation soll Einblicke in die Resistenzübertragung vermitteln, da nach wie vor ein großer Teil der Patient*innen refraktär gegenüber systemischen Therapien wird.

5. Material und Methodik (oder Beobachtungsgut)

5.1. Material

5.1.1. Materialien für die Zellkultur

Materialien	Hersteller
Caki-2 (ATCC HTB-47)	ATCC, Manassas, USA
Pasteurpipetten, Einweg, aus Glas	VWR International GmbH, Darmstadt
Absaughilfe Vacuboy	Integra Biosciences, Fernwald
Pipettierhilfe Pipetboy acu 2	Integra Biosciences, Fernwald
Combitips advanced® 2,5ml, 5ml	Eppendorf SE, Hamburg
Greiner CELLSTAR® serological pipette capacity 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Falcon® 1 mL Serological Pipet, Polystyrene, 0.01 Increments, Individually Packed, Sterile	Corning Incorporated- Life Sciences, Durham, USA
Falcon® 2 mL Serological Pipet, Polystyrene, 0.01 Increments, Individually Packed, Sterile	Corning Incorporated- Life Sciences, Durham, USA
CELLSTAR® Zellkultur-Flaschen 25cm ² , 75cm ² , 175cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einfrierröhrchen CRYO.S™, PP, mit Schraubverschluss, steril, 2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
CoolCell® biocision® alcohol-free cell freezing container	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Nunc™ TripleFlask™ behandelte Zellkulturflasche 500cm ²	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Stericup® Quick Release-GV steriles Vakuumfiltrationssystem	MilliporeSigma, Burlington, USA
LUNA-II™ Automated Cell Counter	Logos Biosystems, Südkorea
LUNA™ Cell Counting Slides	Logos Biosystems, Südkorea
CO ₂ -Inkubator Heraeus® HERAcell®	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Heraeus® HERAsafe® Sicherheitswerkbank HS12	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Centrifuge 5804	Eppendorf SE, Hamburg
Rotor A-4-44	Eppendorf SE, Hamburg
Centrifuge MiniSpin® plus	Eppendorf SE, Hamburg
Mikroskop Axiovert S100	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Nikon Eclipse TS 100 inverses Mikroskop	Nikon Corporation, Tokyo, Japan

Penicillin/Streptomycin Sol., 10.000UN/ml Pen. 10mg/ml Strep., (100ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Pazopanib HCl (GW786034 HCl)	Selleck Chemicals LLC, Houston, USA
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salz- Lösung (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Fetal bovine serum Brazil Origin, sterile filtered, Cell Culture tested, F7524	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trypanblau-Lösung, 0.4%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid reinst (DMSO)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Dulbecco's Modified Eagle's Medium - hoher Glucoseanteil (DMEM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit	Lonza Ltd, Basel

Tabelle 4: Materialien für die Zellkultur

5.1.2. Materialien für die Exosomenisolation

Materialien	Hersteller
Beckman Coulter Optima™ L80K Ultracentrifuge	Beckman Coulter, Inc., Brea, USA
Beckman Coulter Optima™ XPN-80 Ultracentrifuge	Beckman Coulter, Inc., Brea, USA
Typ 70 Ti Festwinkelrotor	Beckman Coulter, Inc., Brea, USA
Centrifuge Bottles Polycarbonate, 26.3 mL, 25 x 89 mm	Beckman Coulter, Inc., Brea, USA
Cap + O-Ring for Polycarbonate 26,3 ml	Beckman Coulter, Inc., Brea, USA
Centrifuge 5804 R	Eppendorf SE, Hamburg
Rotor F-34-6-38	Eppendorf SE, Hamburg
Rotor FA-45-30-11	Eppendorf SE, Hamburg

Tabelle 5: Materialien für die Exosomenisolation

5.1.3. Materialien für das Western Blotting

Material	Hersteller
Intas ChemoCam Imager ECL Type HR 16- 3200	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Thermo Scientific™ Pierce™ ECL Plus Western Blotting-Substrat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Rotamax 120	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Analoger Wippschüttler RS-RS 5	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen
Color Sprout Plus Mini-Zentrifuge	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Bio-Rad Power Pac 1000	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Amersham Biosciences Electrophoresis Power Supply EPS 601	Amersham Biosciences, Uppsala
Präzisionswaage, Science Education SE 2201	VWR International GmbH, Darmstadt
Thermo Scientific™ PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 bis 180 kDa	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermomixer® comfort	Eppendorf SE, Hamburg
Magnetrührer Phoenix RSM-10 HS	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen
Fluorobind-Membran, Oberfläche PVDF Porengröße 0,2 µm, Format: 26,5 cm x 3 m	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Whatman™ Gel Blot Paper for Capillary Blotting & Wicking Applications GB003	GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK
SurPhob Gelloader 10 µl, 0.57 mm, Rundkopf, steril	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
SurPhob Gelloader 200 µl, 0.57 mm, Rundkopf	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
8–16% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 10-well, 30 µl	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Biorad Mini-PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA

Tabelle 6: Materialien für das Western Blotting

Puffer und Reagenzien	Zusammensetzung	Hersteller
Transferpuffer: Modified Towbin's buffer for semidry buffer Towbin and Bjerrum Schafer-Nielsen	<ul style="list-style-type: none"> • 39 mM Glycin p.a., Ph. Eur., USP • 48 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan e Elektrophorese-Qualität • 0,1% SDS (hergestellt aus Dodecylsulfate-Na-salt in pellets) 	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg

	<ul style="list-style-type: none"> • 20% Methanol zur Analyse EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur 	Supelco, Merck KGaA, Darmstadt
Laufpuffer: 10x Tris/Glycine/SDS Buffer for SDS-PAGE applications	<ul style="list-style-type: none"> • Arbeitslösung (1x) für die Elektrophorese 	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Stripping buffer	<ul style="list-style-type: none"> • 200 mM Glycin p.a., Ph. Eur., USP • 0,1% SDS (hergestellt aus Dodecylsulfate-Na-salt in pellets) • 1% Tween® 20 Molekularbiologie-Qualität 	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
	<ul style="list-style-type: none"> • pH 2,2 (durch Titration mit Salzsäure 25%, AnalaR NORMAPUR® analytisches Reagens) 	VWR International GmbH, Darmstadt
Lysepuffer Tris-Triton 1x	<ul style="list-style-type: none"> • Ampuwa® Spüllösung 	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
	<ul style="list-style-type: none"> • 50 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane Elektrophorese-Qualität • 150 mM Natriumchlorid cryst. reinst, Ph. Eur., USP • 0,1% SDS (hergestellt aus Dodecylsulfate-Na-salt in pellets) • 1% CHAPS, research grade • 1% Triton® X-100 molecular biology grade 	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Protease- und Phosphataseinhibitor	<ul style="list-style-type: none"> • cOmplete™ Mini, EDTA-freier Protease- Inhibitor-Cocktail • PhosSTOP™ 	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Lysepuffer komplett	<ul style="list-style-type: none"> • 1x Tris-Triton • 1x Proteaseinhibitor • 1x Phosphataseinhibitor 	

10x TBST (TBS-Tween)	<ul style="list-style-type: none"> • 248 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane Elektrophorese-Qualität • 1,37 M Natriumchlorid cryst. reinst, Ph. Eur., USP • 1% Tween® 20 Molekularbiologie-Qualität 	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
6x Laemmli-Puffer (Arbeitslösung (4x))	<ul style="list-style-type: none"> • 0,5 M Tris(hydroxymethyl)aminomethane Elektrophorese-Qualität • 30% Glycerin pflanzlich, Ph. Eur. • 10% SDS (hergestellt aus Dodecylsulfate-Na-salt in pellets) • 600 mM Dithiothreitol (DTT)-Elektrophorese-Qualität • Spatelspitze Bromphenolblau-Na-Salz • pH 6,8 	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
5% Milch in TBST zum Blockieren	<ul style="list-style-type: none"> • 1x TBST • 5% Skim milk powder for blotting 	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
5% bovines Serumalbumin (BSA) in TBST zum Blockieren	<ul style="list-style-type: none"> • 1x TBST 	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
	<ul style="list-style-type: none"> • 5% Bovine Serum Albumin, A7906, heat shock fraction, pH 7, ≥98% 	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
PBST	<ul style="list-style-type: none"> • 1x Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salz-Lösung (PBS) 	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
	<ul style="list-style-type: none"> • 0,1% Triton® X-100 molecular biology grade 	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg

4%-PFA-PBS bzw. 2%-PFA-PBS	<ul style="list-style-type: none"> 1x Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salz-Lösung (PBS) 	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
	<ul style="list-style-type: none"> 4% bzw. 2% Paraformaldehyd EMPROVE® ESSENTIAL, DAC 	MilliporeSigma, Burlington, USA

Tabelle 7: Liste der Puffer und Reagenzien

Primärantikörper					
Antikörper	Ursprung/ Isotyp	Verdün- nung	Molekular- gewicht	Träger- substanz	Hersteller
Anti-Syntenin antibody [EPR8102] (ab133267)	Kaninchen/ IgG	1:1000	32 kDa	BSA 5% in TBST	abcam, Cambridge, UK
Alix (3A9) Mouse mAb #2171	Maus/ IgG1	1:800	95 kDa	Milch 5% in TBST	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
CD9 (D8O1A) Rabbit mAb #13174	Kaninchen/ IgG	1:1000	22, 24, 35 kDa	BSA 5% in TBST	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
Monoclonal Anti-β-Actin, antibody produced in mouse, A5441	Maus/ IgG1	1:2000	42 kDa	Milch 5% in TBST	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
GM130 (D6B1) XP® Rabbit mAb #12480	Kaninchen/ IgG	1:1000	130 kDa	BSA 5% in TBST	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
Anti-CD63 antibody [EPR5702], (ab134045)	Kaninchen/ IgG	1:1000	30-65 kDa	Milch 5% in TBST	abcam, Cambridge, UK
GAPDH (14C10) Rabbit mAb #2118	Kaninchen	1:1000	37 kDa	Milch 5% in TBST	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
Sekundärantikörper					
Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Trägersubstanz	Hersteller	

Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074	Ziege	1:2000	Entsprechend dem jeweiligen Primärantikörper	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody #7076	Pferd	1:2000	Entsprechend dem jeweiligen Primärantikörper	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA

Tabelle 8: Liste der Primär- und Sekundärantikörper

5.1.4. Materialien für die WST-1-Zellviabilitäts-, Functional- und BCA-Assays

Materialien	Hersteller
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Mehrkanal-Mikroliterpipette Transferpette® S -8	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim
Eppendorf Multipette® 4780	Eppendorf SE, Hamburg
Infinite® F200 PRO	Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich
Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Precision incubator Model INP 200	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach

Tabelle 9: Materialien für die WST-1-Cell-viability-, Functional- und BCA-Assays

5.1.5. Materialien für das NTA-Assay

Materialien/Geräte	Hersteller
NanoSight NS 14C/b with green 532 nm laser module S/N: 1215509	Malvern Panalytical Ltd., Worcestershire, UK
Luca ^{EM} S 658M (DL-658M-OEM)	Andor Technology, Belfast, UK
Injekt®-F Solo, 1 ml, ohne Kanüle, 2-teilig	B.Braun SE, Melsungen

Tabelle 10: Materialien für das NTA-Assay

5.1.6. Materialien für das Uptake Assay

Materialien/Geräte	Hersteller
VECTASHIELD® HardSet™ Antifade Mounting Medium with DAPI (H-1500-10)	Vector Laboratories, Inc., Newark, USA
Alexa Fluor™ 488 Phalloidin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

PKH26 Red Fluorescence Cell Linker Midi Kit for general cell membrane labeling	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Diluent C for Membrane Labeling	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dako Antibody Diluent	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA
Paraformaldehyd EMPROVE® ESSENTIAL, DAC	MilliporeSigma, Burlington, USA
Deckgläser Stärke 1.5H, 24 x 60 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
x-well Zellkulturkammer, 4-well, auf Glas-Objektträger, ablösbarer Rahmen	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Pierce™ Protein Concentrator PES, 100K MWCO	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Laser scanning Microscope LSM 780	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Olympus UPLXAPO 60x oil immersion objective	Evident Corporation, Tokyo, Japan

Tabelle 11: Materialien für das Uptake-Assay

5.1.7. Verbrauchsmaterial und Pipetten

Material	Hersteller
Falcon® 96-well Clear Flat Bottom TC-treated Culture Microplate, with Lid, Individually Wrapped, Sterile	Corning Incorporated- Life Sciences, Corning, USA
Costar® 12-well Clear TC-treated Multiple Well Plates, Individually Wrapped, Sterile	Corning Incorporated- Life Sciences, Corning, USA
Röhrchen, 50 ml, PP, 30/115 mm, konischer Boden, CELLSTAR®, Schraubverschluss blau, natur, graduiert, Schriftfeld, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Röhrchen, 15 ml, PP, 17/120 mm, konischer Boden, CELLSTAR®, Schraubverschluss blau, natur, graduiert, Schriftfeld, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Röhrchen, 14 ml, PS, 18/95 mm, runder Boden, Zwei-Positionen Belüftungsstopfen, transp., steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
PIPETMAN® Pipetten 2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson Incorporated, Middleton, USA
Eppendorf Research® plus Pipetten 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 5 ml	Eppendorf SE, Hamburg

ratiolab® Pipettenspitzen gelb -E- 1-200 µl, im MultiTray®	ratiolab GmbH, Dreieich
ratiolab® Pipettenspitzen blau -E- 100-1200 µl, im MultiTray®	ratiolab GmbH, Dreieich
ratiolab® Pipettenspitzen kristall 0,1-10 µl xl, im MultiTray®	ratiolab GmbH, Dreieich
Sapphire Filterspitze, 10 µl XL, Low Retention, natur, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Filter Tip Universal 100 µl, 20 µl	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Eppendorf Tubes® 5.0 ml - Reaktionsgefäß	Eppendorf SE, Hamburg
Eppendorf Safe-Lock Tubes 2 ml	Eppendorf SE, Hamburg
SafeSeal Reagiergefäß, 1,5 ml, PP	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
SafeSeal Reagiergefäß, 1,5 ml, PP, braun	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Reagiergefäß, 0,5 ml, PP	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
BD Plastipak™ 1 ml Spritze	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Injekt® Luer Solo 5ml, 10ml	B.Braun SE, Melsungen
BD Eclipse™ Sicherheitsinjektionskanülen mit SmartSlip™-Technologie 21G x 1 ½ TW (0,8mm x 40mm)	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA

Tabelle 12: Liste der Verbrauchsmaterialien und Pipetten

5.2. Methodik

5.2.1. Zellkultur

5.2.1.1. Zelllinie Caki-2 WT und Caki-2 Paz

Bei den Experimenten der vorliegenden Doktorarbeit wurde mit Caki-2 Zellen gearbeitet. Die Zellen weisen eine Mutation des VHL-Gens auf [25], zeigen mikroskopisch ein adhärentes Wachstum und werden als Modell für klarzellige Nierenzellkarzinome genutzt [7]. Sie stammen ursprünglich aus dem Primärtumor eines 69-jährigen kaukasischen Mannes [71].

Neben Wildtypzellen (Caki-2 WT), die keine Behandlung mit Pazopanib erhielten, wurden Caki-2 Zellen verwendet, die durch die kontinuierliche Behandlung über drei Monate mit 11 µM Pazopanib HCl eine Resistenz entwickelt hatten (Caki-2 Paz). Diese resistente Zelllinie wurde von unserer Arbeitsgruppe etabliert und für die Experimente dieser Dissertation zur Verfügung gestellt. In den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden in regelmäßigen Abständen Resistenztests mittels WST-1-Zellviabilitäts-Assay bei beiden Zelllinien durchgeführt.

Um eine Beeinflussung der Ergebnisse der Zellkulturexperimente durch eine Kontamination mit Mykoplasmen auszuschließen, wurde ein Mykoplasmentest durchgeführt, der negativ war.

Bei diesem Test handelt es sich um eine biochemische Reaktion, bei der mykoplasmaspezifische Enzyme zur Bildung von ATP führen, was spektrophotometrisch durch die Reaktion von Luciferin und ATP, bei der Licht emittiert wird, gemessen werden kann, wobei das ATP-Level nach Zugabe des Substrates mit dem Level davor ins Verhältnis gesetzt und anhand dieses Verhältnisses entschieden werden kann, ob eine Kontamination vorliegt oder nicht [190].

Durch die kontinuierliche Kultivierung beider Zelllinien über einen Monat wurde ein Zellvorrat in verschiedenen Passagen erarbeitet, wobei mit Zellen der Passage 54 begonnen wurde. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen, wurde bei den Experimenten immer mit Zellen der gleichen Passage des Wildtyps und der resistenten Zellen gearbeitet. Die Subkultur der Zellen für den Zellvorrat erfolgte in 25 cm²-Zellkulturflaschen, wobei je Passage drei biologische Replikate eingefroren und drei biologische Replikate weiterkultiviert wurden. Die Wildtypzellen wurden mit RPMI+10 % fetalem Kälberserum (FCS) kultiviert und die pazopanibresistenten Zellen mit RPMI+10 % FCS mit einer Pazopanibkonzentration von 11 µM, wobei beide Zelllinien im CO₂-Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert wurden. Die Berechnung der benötigten Menge an Pazopanib erfolgte über die Formel:

$$FV \cdot FC = IV \cdot IC$$

Formel 1: Allgemeine Berechnung von Verdünnungen

FV= Zielvolumen (engl.: final volume), FC= Zielkonzentration (engl.: final concentration), IV= Startvolumen (engl.: initial volume), IC= Startkonzentration (engl.: initial concentration)

Da die Pazopanibstocklösung eine Konzentration von 10 mM hat, war es nötig, eine Zwischenkonzentration (Stocklösung 1) von 100 µM herzustellen, um über diese dann letzten Endes auf die gewünschte Konzentration von 11 µM zu kommen. Die Zellen wurden täglich mikroskopiert und zu Beginn der Arbeit in der Zellkultur photodokumentiert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

5.2.1.2. Trypsinierung und Zellzählung

Die Zellen wurden in der Regel alle 2 bis 4 Tage passagiert, wobei sich hierbei als geeignete Zellzahl 2·10⁵ bis 3·10⁵ Zellen bei einer 25 cm²- Zellkulturflasche herausstellte.

Bei der Trypsinierung der Zellen aus einer 25 cm²- Zellkulturflasche wurde zunächst das Medium abgesaugt. Um die Reste des RPMIs, sowie Zelldetritus zu entfernen, wurden die Zellen mit 2 ml PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Trypsin-EDTA in die Kulturflasche gegeben, um die Verbindungen der Zellen mit der Flasche (durch das Trypsin), aber auch untereinander (vor allem durch das EDTA) zu lösen [90]. Die Zellkulturflasche wurde für ca. sieben Minuten im CO₂-Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und gelegentlich mikroskopisch das Ablösen der Zellen kontrolliert. Wenn sich die Zellen gelöst hatten, wurde die Aktivität des Trypsins und des EDTAs durch die Zugabe von 5 ml RPMI + 10% FCS blockiert, da im Kälberserum Proteaseinhibitoren vorhanden sind, die das Trypsin inhibieren [90]. Damit die Zellen, die noch an dem Boden der Flasche haften

geblieben waren, ebenfalls gelöst wurden, wurde mit einer serologischen 5 ml-Pipette die Flasche mehrmals mit der Zellsuspension gespült und anschließend in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Suspension wurde für 3 min bei 1100 rpm in der Zentrifuge 5804 zentrifugiert, sodass sich ein Zellpellet absetzte. Der Überstand wurde vorsichtig mittels der Absaughilfe abgenommen und das Zellpellet mit 3 ml RPMI+10% FCS gründlich resuspendiert.

Von dieser Suspension wurden 10 µl entnommen und mit 10 µl Trypanblau-Lösung 0,4% gemischt. Von diesen 20 µl wurden 10 µl aufgenommen und auf eine Cell Counting Slide gegeben, die wiederum ins Zellzählgerät eingeführt wurde und anhand der die Zellzahl bestimmt werden konnte.

Trypanblau ist ein Farbstoff, der die Zellmembran nicht durchdringen kann, sodass hauptsächlich tote Zellen, deren Zellmembran geschädigt ist, den Farbstoff aufnehmen, wohingegen die lebenden Zellen ungefärbt bleiben, sodass diese unterschieden und gezählt werden können [33,207].

Die Zellzahl wurde zur Aussaat der Zellen in die 96-Well-, die 12-Well-Platte und den Kammerobjektträger sowie anfangs für die 25 cm²- Zellkulturflaschen bestimmt. Zur Anzucht der Zellen für die Exosomenisolation wurde allerdings nicht mit der Zellzahl, sondern mit Verhältnissen (siehe Punkt 5.2.4) gearbeitet.

Nach der Zellzählung wurde die berechnete Menge der Zellsuspension in die Kulturflasche zum Medium gegeben, wobei das Zielvolumen bei 4,5 ml lag. Da mit verschiedenen Größen an Zellkulturflaschen gearbeitet wurde, veränderten sich dementsprechend auch die Volumina, die an RPMI+10%FCS, PBS und Trypsin-EDTA eingesetzt wurden (siehe Tabelle 13).

Größe der Zellkulturflasche [cm ²]	Volumen an PBS [ml]	Volumen an Trypsin-EDTA [ml]	Volumen an RPMI+10% FCS zum Blockieren [ml]	Volumen an RPMI+10% FCS zum Resuspendieren [ml]	Zielvolumen für Zellkulturflasche [ml]
75 cm ²	5 ml	2 ml	6 ml	5 ml	12 ml
175 cm ²	10 ml	5 ml	10 ml	10 ml	30 ml
500 cm ²	30 ml	20 ml	30 ml	20 ml (bei Zellzählung); 10 ml (bei Zellysat)	80 ml

Tabelle 13 Verwendete Volumina bei der Trypsinierung

5.2.1.3. Passagieren der Caki-2 Paz

Grundsätzlich wurden die Caki-2 Paz genau wie die Caki-2 WT trypsiniert (siehe Unterpunkt 5.2.1.2). Da die Zellen jedoch, um ihre Resistenz aufrechtzuerhalten, eine kontinuierliche

Behandlung mit einer exakten Konzentration von 11 µM Pazopanib benötigten, musste dies bei der Berechnung der Menge an Medium miteinbezogen werden. Weil der Stress des Trypsinierungsvorgangs in Kombination mit Pazopanib zu massivem Zellsterben geführt hätte, wurde nach dem Aussäen in die Kulturf flasche mindestens 3 Stunden gewartet, sodass die Zellen in der Kulturf flasche anwachsen konnten, bevor das Medikament zum Medium hinzugegeben wurde. Die Berechnung des Volumens des Mediums erfolgte wie folgt (am Beispiel der 25 cm²-Flasche):

$$FV \cdot FC = IV \cdot IC$$

$$IV = \frac{FV \cdot FC}{IC}$$

$$FV = 4500 \mu l$$

$$FC = 11 \mu M$$

$$IC = 100 \mu M \text{ (Stock 1)}$$

IV = ? (Volumen aus Stock 1, mit dem die Zellen behandelt werden)

$$IV = \frac{4500 \mu l \cdot 11 \mu M}{100 \mu M} = 495 \mu l$$

$$4500 \mu l - 495 \mu l = 4005 \mu l \text{ (Medium + Zellsuspension)}$$

Formel 2: Volumina bei der Pazopanibgabe nach der Trypsinierung von Caki-2 Paz (in 25 cm²-Flasche); FV= Zielvolumen (engl.: final volume), FC= Zielkonzentration (engl.: final concentration), IV= Startvolumen (engl.: initial volume), IC= Startkonzentration (engl.: initial concentration)

Benötigtes Volumen an Medium:

4005 µl - berechnetes Volumen der Zellsuspension = Volumen des Mediums, das den Zellen vorgelegt wird

Formel 3: Vorzulegendes Volumen an Medium bei der Trypsinierung von Caki-2 Paz (nach Abzug des Volumens von Stock 1 vom Finalvolumen (in 25 cm²-Flasche))

Größe der Zellkulturflasche	Volumen von Stock 1 des Pazopanib (100µM)	Volumen RPMI+10% FCS + Zellsuspension
25 cm ²	495 µl	4005 µl
75 cm ²	1320 µl	10.680 µl
175 cm ²	3300 µl	26.700 µl
500 cm ²	8800 µl	71.200 µl

Tabelle 14: Volumina des Pazopanibstock 1 (100 µM) und des Mediums + Zellen

Das Volumen, das von Stock 0 (10mM) benötigt wurde, um 1 ml Stock 1 (100 µM) zu erzeugen, berechnete sich wie folgt:

$$FV \cdot FC = IV \cdot IC$$

$$IV = \frac{FV \cdot FC}{IC}$$

$$FV = 1000 \mu l$$

$$FC = 100 \mu M$$

$$IC = 10 \text{ mM bzw. } 10.000 \mu M \text{ (Stock 0)}$$

$$IV = ? \text{ (Volumen aus Stock 0)}$$

$$IV = \frac{1000 \mu l \cdot 100 \mu M}{10.000 \mu M} = 10 \mu l$$

Formel 4: Volumen von Paz (Stock 0) zur Herstellung von 1 ml Stock 1
 FV= Zielvolumen (engl.: final volume), FC= Zielkonzentration (engl.: final concentration), IV= Startvolumen (engl.: initial volume), IC= Startkonzentration (engl.: initial concentration)

Benötigte Menge Medium: 1000 μ l (FV)– 10 μ l (IV)= 990 μ l Medium

Formel 5: Volumen des Mediums zur Herstellung von 1 ml Stock 1
 FV= Zielvolumen (engl.: final volume), IV= Startvolumen (engl.: initial volume)

Eine Besonderheit stellte die Pazopanibbehandlung der Zellen in den Triple flasks (500 cm²-Zellkulturflaschen) dar. Weil die Flasche einen 3-lagigen Aufbau hat, war es nicht möglich, das Medikament direkt in die Flasche zu pipettieren.

Nach Ablauf der 3 Stunden, in denen die Zellen nach der Trypsinierung ruhen durften, wurden zuerst die 8800 μ l von Stock 1 in einen Erlemeyerkolben vorgelegt. Zu diesen 8800 μ l wurde dann das komplette Medium einer Triple flask durch Schütten hinzugefügt, da man in diese Flaschen nicht mit einer Pipette hineingelangt. Um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern, mussten diese Schritte zügig geschehen. Das Medium und das Medikament wurden durch kontrolliertes Schwenken des Erlemeyerkolbens gemischt und die Triple flask wieder mit dem Medium befüllt. So konnte gewährleistet werden, dass alle Ebenen der Flasche mit der gleichen Konzentration von Pazopanib behandelt wurden.

5.2.1.4. Einfrieren der Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen, wie bereits in Abschnitt 5.2.1.2 beschrieben, trypsiniert. Nachdem die Zellen mit 5 ml RPMI+10% FCS resuspendiert wurden, wurden sie erneut für 3 min bei 1100 rpm in der Zentrifuge 5804 pelletiert und der Medienüberstand mit Hilfe einer ungestopften Pasteurpipette und der Absaughilfe vorsichtig entfernt. Das Zellpellet wurde umgehend mit einer serologischen Pipette mit 2 ml des Einfriermediums resuspendiert und zügig in ein Einfrierröhrchen abgefüllt und direkt auf Eis gelagert. Damit die Zellen durch den Temperatursturz von 4°C auf -80°C keine Schäden durch Kristallbildung oder Elektrolytverschiebungen davontrugen [236,302], wurden die Einfriercaps in einer Einfrierbox gelagert, in der die Temperatur um 1°C pro Minute bei Lagerung im -80°C-Schrank sank. Das Einfriermedium setzt sich zusammen aus DMEM +10%FCS +10% DMSO. Das DMSO schützt vor Gefrierschäden, indem es in die Zellen eindringt und sie vor zu hohen Elektrolytkonzentrationen bewahrt [236].

5.2.1.5. Auftauen der Zellen

Da DMSO in der zum Einfrieren verwendeten Konzentration bei Raumtemperatur für die Zellen toxisch ist [236], wurden die Einfriereröhrchen, nachdem sie aus dem -80°C-Schrank genommen wurden, direkt auf Eis gelagert. In einem Zentrifugenröhrchen mit Rundboden

wurden 8 ml RPMI + 10 % FCS vorgelegt. Mit einer gestopften Pasteurpipette aus Glas wurde im Anschluss Medium auf die gefrorenen Zellen gegeben und der dadurch auftauende Überstand direkt zu den 8 ml Medium in das Röhrchen gegeben, um das DMSO zu verdünnen. Das Pipettieren zwischen dem Einfriercap und dem Zentrifugenröhrchen wurde so lange fortgeführt, bis alle Zellen in RPMI+ 10% FCS gelöst und aufgetaut waren.

Die aufgetauten Zellen wurden nun für 3 min bei 1100 rpm mit der Zentrifuge 5804 zentrifugiert, sodass ein Pellet entstand. Der Überstand wurde wieder mit einer ungestopften Pipette abgesaugt und das Pellet mit 2 ml Medium resuspendiert. Je nachdem, welche Größe an Kulturflasche eingefroren wurde, musste im Anschluss entweder 2,5 ml Medium bei 25 cm²-Flaschen oder 10 ml Medium bei 75 cm²-Flaschen in die jeweilige Flasche vorgelegt werden. Zu diesem Medium wurde dann die komplette Suspension hinzugegeben, die Zellen durch sanftes Schwenken gleichmäßig verteilt und die Zellkulturflaschen im CO₂-Inkubator inkubiert. Am Tag nach dem Auftauen musste ein Medienwechsel erfolgen, um etwaige DMSO-Rückstände zu entfernen. Die Caki-2 Paz erhielten auch erst bei diesem Medienwechsel noch einmal Medium mit 11µM Pazopanib.

5.2.2. WST-1-Zellviabilitäts-Assay

Bei WST-1-Zellviabilitätstests wird das Tetrazoliumsalz WST-1 (Natriumsalz von 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen Disulfonat) in Anwesenheit von einem intermediären Elektronenakzeptor und NADH zum farbigen, wasserlöslichen Formazan umgesetzt [119,120]. Das WST-1 wird extrazellulär mithilfe eines Elektronentransfers über die Plasmamembran reduziert, wobei der Großteil des dafür benötigten NADH aus dem mitochondrialen Citratzyklus stammt [17]. Die Menge des gebildeten Formazans ist proportional zum NADH und somit direkt abhängig von der Zahl der lebenden Zellen [17,119]. Je mehr Zellen leben, desto mehr Formazan wird gebildet und der Farbton des Reagenzes ändert sich von hellrot zu dunkelorange. Dies kann quantifiziert werden durch die spektrophotometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm mittels Mikrotiterplattenlesegerät. Ausgewertet wurden diese Versuche mittels Microsoft® Excel.

5.2.2.1. Zellaussaat und Behandlung mit Pazopanib/DMSO

Für die WST-1-Versuche wurden immer $2 \cdot 10^3$ Zellen pro Well in eine 96-Well-Platte ausgesät. Um eine Verdunstung des Mediums zu verhindern, wurden bei allen Versuchen die Wells, die am Rand der Platte gelegen waren, mit 100 µl PBS befüllt. Nach dem Aussäen der Zellen in die Wells wurden die Platten im CO₂-Inkubator inkubiert und am nächsten Tag mit DMSO oder Pazopanib behandelt. DMSO wurde als Kontrolle gewählt, da DMSO die Trägersubstanz von Pazopanib in vitro ist (siehe Produktdatenblatt [237]). Die DMSO-Konzentration, die als Kontrolle appliziert wurde, berechnete sich ausgehend vom DMSO-Anteil der höchsten im Versuch eingesetzten Pazopanibkonzentration, um ausschließen zu können, dass die beobachteten zytotoxischen Effekte durch das DMSO ausgelöst wurden. Mit einer

Mehrkanalpipette wurden 100 µl des Mediums aus allen Wells der Platte entnommen, sodass die Zellen permanent mit 100 µl bedeckt waren und nicht austrockneten. Die Berechnung der Pazopanibkonzentration erfolgte anhand der oben aufgeführten Formel 1, wobei beachtet werden muss, dass die Zielkonzentration immer die doppelte Konzentration war, weil die Zellen stets mit 100 µl Medium bedeckt waren und sich somit die Konzentration durch das Hinzufügen von 100 µl Medikament halbierte. Mit Hilfe einer Mehrfachdispenserpipette wurden pro Well 100µl Pazopanib bzw. DMSO appliziert.

5.2.2.2. Absorptionsmessung mittels Mikrotiterplattenlesegerät

Die Zellen wurden für 72 Stunden mit Pazopanib bzw. DMSO inkubiert. Das WST-1 Reagenz wurde unter der abgedunkelten Werkbank mit RPMI+10 % FCS gemischt, wobei der finale WST-1-Anteil 10% betrug. Die 96-Well-Platte wurde durch Schütten entleert und die mit Zellen bewachsenen Wells mit je 100 µl des WST-1/RPMI-Gemischs befüllt. Zusätzlich wurden 3 leere Wells ebenfalls damit befüllt, um bei der Auswertung die Absorption, die nur von dem Gemisch stammt, abziehen zu können. Die Platten wurden für 60 min im CO₂-Inkubator inkubiert, die Absorption bei 450 nm gemessen und anschließend die Messung nach erneuter Inkubation und insgesamt 90 min wiederholt. Zur Analyse wurden jeweils immer die Werte nach 90 min verwendet. Für die Messung wurde die Software i-control™ 1.7 verwendet.

5.2.2.3. Vorversuch zu den Resistenztests

Beim Vorversuch zu den Resistenztests wurden die Caki-2 WT und Caki-2 Paz-Zellen in je 3 technischen und 2 biologischen Replikaten (Caki-2 WT 1 und -WT 2, bzw. -Paz 1 und -Paz 2) in der 96-Well-Platte ausgesät und mit 11 µM Pazopanib und 0,11% DMSO entsprechend dem Schema in Abbildung 2 behandelt. Dieser Versuch war dazu gedacht, die Viabilität der Zellen bei der IC₅₀ von 11 µM Pazopanib zu bestimmen, um zu überprüfen, ob die Caki-2 Paz resistent gegen das Medikament sind und dementsprechend besser als die Caki-2 WT überleben. Der dabei errechnete Wert wurde zur Berechnung des Mittelwerts der Viabilitäten unter 11 µM Pazopanib hinzugezogen. Die Viabilität wurde berechnet, indem die Absorptionen der Caki-2 Paz zur Absorption der Caki-2 WT, die mit DMSO behandelt wurden, normalisiert wurden (Viabilität normalisiert zu Caki-2 WT/DMSO). Zunächst wurden hierzu die Mittelwerte der Absorptionen der 3 technischen Replikate berechnet. Diese Mittelwerte wurden dann normalisiert:

$$\begin{aligned} & \text{Zellviabilität der Caki-2 WT unter Pazopanib (normalisiert zu Caki-2} \\ & \text{WT/DMSO)}[\%] = \frac{\text{Mittelwert der Absorptionen der Caki-2 WT unter } 11\mu\text{M Pazopanib}}{\text{Mittelwert der Absorptionen der Caki-2 WT unter DMSO}} \cdot 100 \\ & \text{Zellviabilität der Caki-2 Paz unter Pazopanib (normalisiert zu Caki-2} \\ & \text{WT/DMSO)}[\%] = \frac{\text{Mittelwert der Absorptionen der Caki-2 Paz unter } 11\mu\text{M Pazopanib}}{\text{Mittelwert der Absorptionen der Caki-2 WT unter DMSO}} \cdot 100 \end{aligned}$$

Formel 6: Beispiele für Normalisierung zu Caki-2 WT unter DMSO

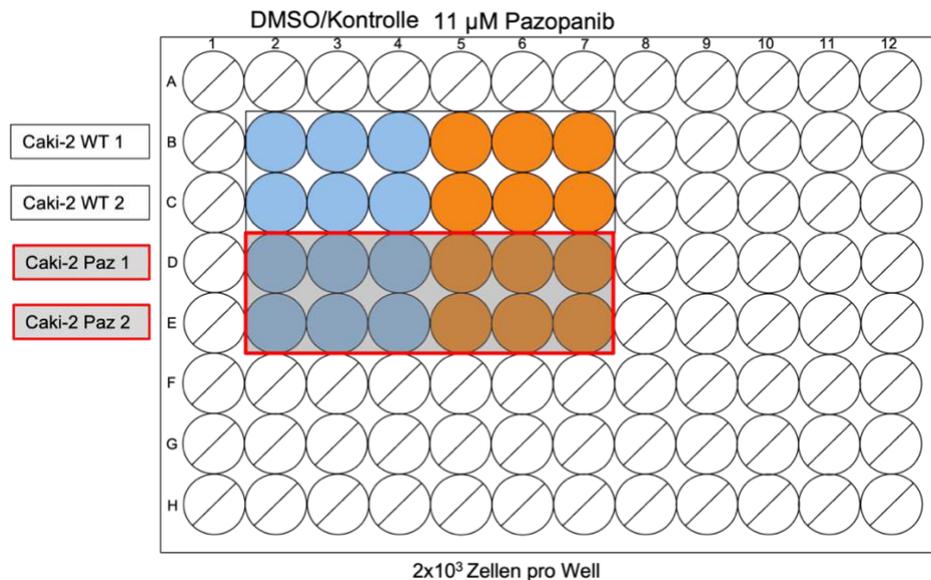


Abbildung 2: Belegung der 96-Well-Platte des ersten Vorversuchs zu den Resistenztests 2·10³ Zellen/Well; schwarz umrandet: Caki-2 WT1= biologisches Replik 1 der Caki-2 Wildtypzellen; Caki-2 WT2= biologisches Replik 2 der Caki-2 Wildtypzellen; rot umrandet: Caki-2 Paz 1= biologisches Replik 1 der pazopanibresistenten Caki-2 Zellen; Caki-2 Paz 2= biologisches Replik 2 der pazopanibresistenten Caki-2 Zellen

5.2.2.4. Bestimmung der IC₅₀

Die aus den Vorversuchen unserer Forschungsgruppe ermittelte IC₅₀ von 11 μ M Pazopanib [293] wurde zu Beginn der Arbeit überprüft. Bei der IC₅₀ handelt es sich um die Konzentration, die nötig ist, um eine enzymatische Reaktion um 50% zu hemmen [27]. Das bedeutet angewandt auf die WST-1-Untersuchung, dass es sich um die Konzentration an Pazopanib handelt, bei der die Viabilität der Zellen bei 50 % liegt. Wenn es sich also um resistente Zellen handelt, liegt diese IC₅₀ signifikant höher als bei sensitiven Zellen. Um dies zu ermitteln, wurde wieder in 2 biologischen und je 3 technischen Replikaten gearbeitet. Da insgesamt 7 verschiedene Pazopanibkonzentrationen (3 μ M, 6 μ M, 11 μ M, 14 μ M, 18 μ M, 20 μ M sowie 25 μ M) und 0,25% DMSO als Kontrolle getestet wurden, wurden bei diesen Versuchen immer zwei 96-Well-Platten ausgesät (siehe Schema in Abbildung 3). Die Zellen wurden in die Platten, wie unter Punkt 5.2.2.1 beschrieben, ausgesät, über 72 Stunden mit den verschiedenen Konzentrationen inkubiert und gemäß Unterpunkt 5.2.2.2 die Absorptionen im WST-1-Test ermittelt. Zur Bestimmung der IC₅₀ wurde ein Diagramm erstellt, bei dem die Viabilität [%] auf der x-Achse und die Pazopanibkonzentration [μ M] auf der y-Achse aufgetragen wurden. Anhand der Formel der Trendlinie zu diesem Diagramm konnte somit die IC₅₀ berechnet werden. Aus den IC₅₀-Werten der einzelnen Versuche wurde anschließend ein Mittelwert berechnet.

Aus den Absorptionen der einzelnen technischen Replikate wurde für jedes biologische Replikat ein Mittelwert pro Konzentration berechnet und aus den einzelnen Mittelwerten ein gemeinsamer Mittelwert für alle Konzentrationen inklusive der Standardfehler berechnet. Dieser Mittelwert wurde dann normalisiert zu Caki-2 WT unter DMSO und die Viabilitäten im Liniendiagramm graphisch dargestellt. Die T-Tests wurden mit Microsoft® Excel berechnet.

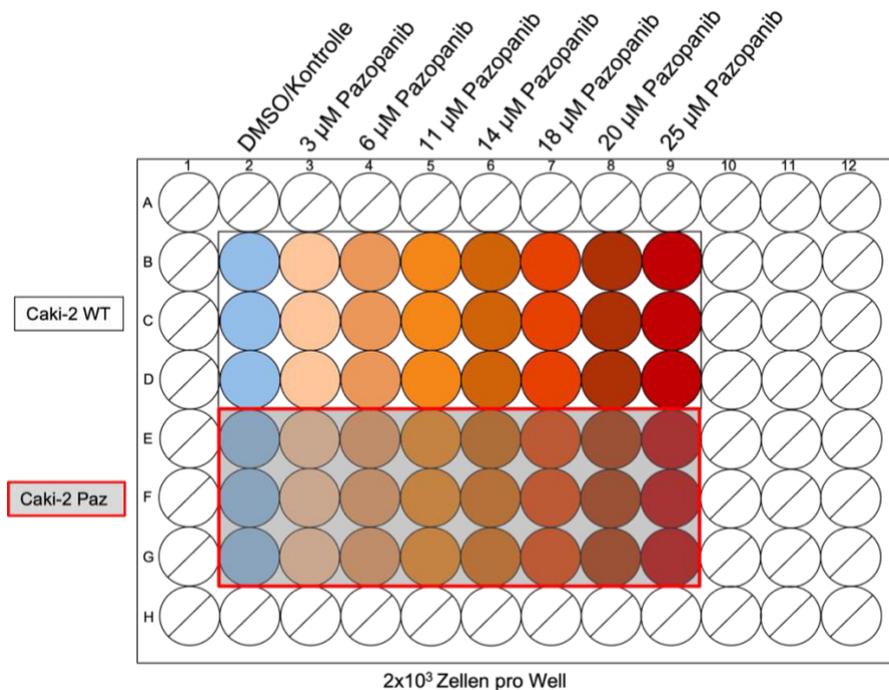


Abbildung 3: Belegung der 96-Well-Platte zur Bestimmung der IC₅₀
 Behandlung mit (von links nach rechts): 0,25% DMSO (Kontrolle), 3 µM Pazopanib, 6 µM Pazopanib, 11 µM Pazopanib, 14 µM Pazopanib, 18 µM Pazopanib, 20 µM Pazopanib, 25 µM Pazopanib; rot umrandet: Wells mit Caki-2 Paz; schwarz umrandet: Wells mit Caki-2 WT; 2·10³ Zellen/Well

5.2.3. Exosomenisolation

Bei der Exosomenisolation wurde auf das Prinzip der differentiellen Ultrazentrifugation zurückgegriffen. Durch die unterschiedliche Größe, Dichte und Form der verschiedenen Bestandteile der Proben, die Einwirkung von verschiedenen Zentrifugalkräften und die mehrfache Zentrifugation werden zunächst die Zellen und Zellfragmente sowie apoptotische Körper oder Proteine abgetrennt, sodass am Ende der Zentrifugationsschritte ein reines Exosomenpellet zurückbleibt [315].

5.2.4. Anzucht der Zellen für die Exosomenisolation

Um eine ausreichende Menge an Exosomen für die Experimente zu isolieren, war es nötig, die Zellen auf Triple flasks hochzuziehen (dreilagige 500 cm²-Zellkulturflaschen). Aufgrund des recht langsamen Wachstums mit einer Verdopplungszeit von 30-32 Stunden waren verschiedene Zwischenschritte notwendig. Die Zellen wurden nach dem Auftauen eines Einfrierröhrchens (25 cm²-Zellkulturflasche) zunächst in einer 25 cm²-Zellkulturflasche kultiviert, bis die Zellen konfluent den Boden bedeckten. Die Flasche wurde dann trypsinisiert und je ein Drittel der Zellen in je eine neue 25 cm²-Zellkulturflasche ausgesät, wobei eine Flasche als Backup, eine zum Einfrieren und eine zum Hochziehen für die Exosomenisolation (im weiteren als Subkultur bezeichnet) gedacht war. Wenn auch diese Flaschen konfluent bewachsen waren, wurden die gesamten Zellen der Subkulturflasche in eine 75 cm²-Zellkulturflasche ausgesät (Verhältnis 1:3). Die Backup-Flasche wurde ebenfalls mitgesplittet und ein Drittel der Zellen wieder in eine 25 cm²-Flasche ausgesät. Die 75 cm²-Zellkulturflasche wurde nach etwa 3 bis 4 Tagen bei einer Konfluenz von 80-90% trypsinisiert und die Zellen auf

je zwei 175 cm²-Zellkulturflaschen aufgeteilt (Verhältnis 1:5). Dieser Zwischenschritt war insbesondere wegen der Caki-2 Paz-Zellen nötig, da diese durch die Behandlung mit 11 µM Pazopanib etwas langsamer als die Caki-2 WT-Zellen wuchsen, weshalb der direkte Wechsel auf die Triple flasks nicht möglich gewesen wäre. Damit die beiden Zelllinien bei der Isolation die gleiche Passage und auch die gleichen Zwischenschritte durchlaufen hatten und damit besser vergleichbar waren, musste also auch der Wildtyp diesen zusätzlichen Schritt über die 175 cm²-Zellkulturflaschen gehen. Nach ca. 4 Tagen waren die 175 cm²-Flaschen so weit, dass die Zellen in Triple flasks ausgesät werden konnten. Hierzu wurde je eine 175 cm²-Flasche auf zwei Triple flasks aufgeteilt (Verhältnis 1:5,7), sodass am Ende 4 Triple Flasks der jeweiligen Zelllinie zur Exosomenisolation genutzt werden konnten. Um zu verhindern, dass die Caki-2 Paz über die Dauer der Zellkultur ihre Resistenz verlieren, wurden die Zellen permanent mit 11 µM Pazopanib kultiviert und erst beim Wechsel auf das exosomendepletierte Medium wurden die Zellen ohne das Pazopanib geführt.

Die Anzahl der benötigten Triple flasks war von dem Experiment abhängig, das sich an die Isolation anschloss. Für die Functional Assays waren 4 Triple flasks nötig, für das Western Blotting 2-3 Triple flasks und für das NTA-Assay wurden die Exosomen aus 2 Triple flasks isoliert und deren Zellen gezählt. Beim Uptake Assay wurden die Exosomen aus insgesamt 6 Triple flasks genutzt (2 Triple flasks, die bei der Isolation für das NTA übrigblieben und 4 Triple flasks, die für das Uptake Assay kultiviert wurden).

5.2.4.1. Medienwechsel der Triple flasks und Herstellung von ED-FCS

Um eine Beeinflussung der Versuche durch die Exosomen aus dem fetalen Kälberserum (FCS) zu vermeiden [152], wurden die Zellen 72 Stunden vor der Exosomenisolation mit Medium mit 10% exosomendepletiertem FCS (ED-FCS) kultiviert. Dieser Medienwechsel fand in der Regel nach 3 Tagen bei einer Konfluenz von 50-60 % statt, da die Caki-2 WT- und Caki-2 Paz-Zellen innerhalb der 72 Stunden zu einer Konfluenz von 80-90 % wuchsen, was optimal zur Exosomenisolation war. In den 3 Tagen vor dem Medienwechsel wurden die Caki-2 Paz-Zellen in den Triple flasks mit Pazopanib behandelt. Sobald die Zellen mit RPMI und 10% ED-FCS kultiviert wurden, wurde kein Pazopanib mehr appliziert, um den Zellstress zu reduzieren. Der Medienwechsel in den Triple flasks erfolgte durch dreimaliges Spülen mit je 25 ml PBS. Durch den dreilagigen Aufbau der Flaschen kann keine Pipette benutzt werden. Das ED-FCS wurde aus dem nativen FCS durch Ultrazentrifugation gewonnen. Hierzu wurde das Serum unter der sterilen Werkbank in 8 Ultrazentrifugenröhrchen mit einem Gewicht von je 56,0 g abgefüllt und diese Röhrchen für 16 bis 18 Stunden bei 50.000 rpm (257.000 x g bei r_{\max} (vergleiche [15])) und 4°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Röhrchen vorsichtig einzeln aus der Zentrifuge genommen und der klare Überstand in 50 ml Röhrchen umgefüllt. Durch die lange Zeit der Zentrifugation hatte sich ein sehr großes rötliches Pellet in den Ultrazentrifugenröhrchen abgesetzt, während der Überstand fast

glasklar war. Um das ED-FCS bei den Zellen ohne Antibiose einsetzen zu können, wurde es im Anschluss noch steril filtriert. Das Medium wurde genau wie das normale Medium angesetzt, indem zu RPMI 10% ED-FCS hinzugefügt wurden.

5.2.4.2. Differentielle Zentrifugation und Ultrazentrifugation

Nachdem die Zellen für 72 Stunden mit RPMI+ 10% ED-FCS kultiviert worden waren, wurde das Medium aus den Triple flasks in 50 ml Zentrifugenröhrchen geschüttet und zunächst für 20 min bei 2000 x g und 4°C in der Zentrifuge 5804 R zentrifugiert. Das Medium wurde in neue 50 ml-Röhrchen umgefüllt. Die Zellrückstände, die sich hierbei absetzten, wurden verworfen. Der nächste Schritt war erneut eine Zentrifugation mit der Zentrifuge 5804 R für 30 min bei 15.000 x g und 4°C, wodurch wieder ein Pellet entstand, welches ebenfalls verworfen wurde und der Überstand wiederum in neue 50 ml-Röhrchen umgefüllt wurde. Damit der Festwinkelrotor der Ultrazentrifuge keine Unwucht hat, wurden die Proben vor der Ultrazentrifugation auf die erste Nachkommastelle genau auf 56,0 g abgewogen. Da der Rotor der Ultrazentrifuge genau 8 Probenröhrchen gleichzeitig fassen kann, aber bei 4 Triple flasks mit je 80 ml Medium insgesamt 13 Röhrchen befüllt wurden, musste die Zentrifuge mehrfach laufen. Das Röhrchen, bei dem das Medium nicht mehr für genau 56,0 g ausreichte, wurde mit PBS aufgefüllt. Bevor die Ultrazentrifuge gestartet wurde, wurde eine Hilfslinie auf die Röhrchen aufgezeichnet, anhand der eine Orientierung beim Pipettieren nach der Zentrifugation möglich war. Die Röhrchen wurden mit nach außen zeigender Markierung in den Rotor gesetzt, sodass die Exosomen im Bereich der Markierung zu erwarten waren. In der ersten Zentrifugationsrunde wurden zunächst 8 Zentrifugenröhrchen für 1 h 30 min bei 40.000 rpm (165.000 x g bei r_{\max} (siehe Herstellerangabe [15])) und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und im unteren Bereich des Röhrchens entlang der Markierung ca. 30- bis 50-mal mit 1 ml PBS die Röhrchenwand abgespült, um die Exosomen mit dem PBS aus dem Röhrchen in ein Sammelröhrchen zu überführen. Wenn sich durch das Pipettieren viel Schaum gebildet hatte, wurde das Röhrchen zusätzlich mit 1 ml PBS gespült, um die gesamte Flüssigkeit in das neue Sammelgefäß zu überführen. So wurde mit allen 8 Röhrchen verfahren. Die anderen 5 Proben wurden zusammen mit 3 Tararöhrchen bei 40.000 rpm (165.000 x g) für 1 h 30 bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde genau wie bei den anderen 8 Röhrchen vorgegangen. Nachdem alle Proben in ein gemeinsames Röhrchen überführt worden waren, wurde dieses Röhrchen zusammen mit 7 Tararöhrchen erneut für 1 h 30 min bei 40.000 rpm (165.000 x g) und 4°C zentrifugiert. Hierdurch entstand ein Exosomenpellet, das makroskopisch bei genauer Inspektion sichtbar war. Zur besseren Wiederauffindbarkeit wurde die Lage des Pellets auf dem Röhrchen markiert. Anschließend wurde der PBS-Überstand vorsichtig verworfen und die übrigbleibende Flüssigkeit mit einer Pipette entfernt, um nicht durch zu kräftiges Schütten das Pellet zu lösen. Daraufhin wurde das Pellet je nach Pelletgröße entweder mit 70 µl, 100 µl oder 120 µl resuspendiert, indem

vorsichtig PBS in Pelletnähe pipettiert wurde. Zu beachten war hierbei, dass die Pipette nur in die Nähe und nicht direkt an das Pellet kam, da Exosomen wegen ihrer klebrigen Eigenschaft schnell verklumpen und die Pipettenspitze so verstopft werden konnte. Das Resuspendieren wurde so lange fortgesetzt, bis das Pellet gelöst war. Die Exosomen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, zum Transport auf Eis gelagert und bis zum BCA-Assay im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Je nachdem, für welches Experiment die Exosomen isoliert wurden, variierte der letzte Schritt der Isolation. Für die Functional Assays und das Uptake Assay wurden die Exosomen mit PBS resuspendiert. Für das NTA-Assay wurden sie mit 2%-PFA-PBS (Paraformaldehyd) gelöst, um sie länger lagern zu können, ohne sie einzufrieren. Für den Western Blot wurde ein Lysat erzeugt und die Exosomen dafür mit Lysepuffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren resuspendiert und für 30 min auf Eis lysiert. Nach den 30 min wurde das Lysat bei 20.000 x g für 5 min bei 4°C in der Zentrifuge 5804 R zentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gefüllt und das entstandene Pellet verworfen. Alle Proben wurden im Kühlschrank gelagert, bis das BCA-Assay durchgeführt wurde. Danach wurden sie dem BCA-Assay entsprechend aliquotiert und bei -80°C gelagert, mit Ausnahme der Exosomen für das NTA-Assay, die im Kühlschrank verblieben.

5.2.5. Zelllysate für die SDS-Page

Um ein Zellpellet für das Zelllysate zu generieren, wurden die Caki-2-Zellen aus einer 25 cm²-Zellkulturflasche zunächst trypsiniert (siehe Punkt 5.2.1.2), und mit 5 ml RPMI+10% FCS blockiert. Die Zellsuspension wurde für 3 Minuten bei 1100 rpm in der Zentrifuge 5804 pelletiert und anschließend nach Absaugen des RPMIs mit 1 ml PBS resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mittels MiniSpin® plus Zentrifuge erneut für 3 Minuten bei 1100 rpm pelletiert. Das PBS wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet umgehend in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur Herstellung des Lysats aufbewahrt.

Zur Lyse des Pellets wurde dieses auf Eis aufgetaut und mit Lysepuffer vorsichtig resuspendiert. Der Lysepuffer beinhaltet Protease- und Phosphataseinhibitoren, um eine Degradation der Proteine zu verhindern [84]. Auf Eis gelagert lysierten die Zellen über 30 Minuten und wurden gelegentlich resuspendiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Lysat für 25 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C mit der Zentrifuge 5804 R zentrifugiert, um Rückstände des Zytoskeletts der Zellen zu pelletieren und ein reines Lysat zu erhalten. Das Lysat wurde nach der Zentrifugation vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

5.2.6. BCA-Assay

Das BCA-Assay wurde durchgeführt, um den Proteingehalt der Proben zu bestimmen. Die Proteine der Probe führen im alkalischen Milieu zur Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ [255]. Dies geschieht unter anderem durch die Oxidation von Tyrosin, Cystein und Tryptophan sowie die Reaktion von Cu²⁺ mit Peptidbindungen [305]. Der Name BCA steht für die Bicinchoninsäure,

die durch eine Chelatkomplexbildung mit den entstandenen Kupferkationen zu einer violetten Färbung der Probe führt [255]. Diese Verfärbung kann spektrophotometrisch gemessen werden. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration benötigt man eine Standardkurve, für die Albumin (BSA) in neun verschiedenen Konzentrationen (0 µg/ml, 31,25 µg/ml, 62,5 µg/ml, 125 µg/ml, 250µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml, 2000 µg/ml) gemessen wurde. Zur Verdünnung des Albuminstandards wurde je nach Bestimmung der Probe entweder PBS (für funktionelle Untersuchungen) oder Lysepuffer (für das Western Blotting) gewählt. Hierzu wurde der Lysepuffer ohne Protease- und Phosphataseinhibitoren eingesetzt. Die zu untersuchende Probe wurde, um Probenmaterial einzusparen, im Verhältnis 1:5 mit dem entsprechenden Puffer verdünnt, wobei hier beim Lysepuffer Protease- und Phosphataseinhibitoren hinzugefügt wurden. Um einen Mittelwert der Messwerte bilden zu können, wurden in der 96-Well-Mikrotiterplatte zwei Wells pro Standard und pro Probe mit je 10 µl pro Well pipettiert. Zu diesen 10 µl wurden jeweils 200 µl des BCA-Reagenz hinzugefügt. Das BCA-Reagenz wurde erzeugt, indem 50 Teile von Reagenz A mit einem Teil von Reagenz B vermischt wurden. Zur Berechnung des Finalvolumens des BCA-Reagenz muss die Anzahl aller zu messenden Wells mit 200 µl multipliziert werden. Nach Hinzufügen des BCA-Reagenz zu den Proben auf der 96-Well-Platte wurde diese für 30 Sekunden auf dem Schüttler gemischt und für 30 min bei 37° C im Wärmeschrank inkubiert. Im Anschluss wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Anhand der gemessenen Albuminstandardwerte wurde mittels Microsoft® Excel eine Kurve erstellt, wobei die Konzentration auf der y-Achse und die Absorption auf der x-Achse aufgetragen wurde. Die Konzentration der Probe wurde anhand der Gleichung der Trendlinie dieser Kurve berechnet.

5.2.7. Western Blotting

Das Western Blotting wurde durchgeführt, um den Erfolg der Exosomenisolation nachzuweisen. Zum einen kann man mittels Western Blotting Exosomenmarker wie z.B. CD63, CD9, Alix oder Syntenin nachweisen, zum anderen kann man damit auch die „Reinheit“ der Isolation überprüfen, indem zelltypische Marker wie das Golgi-Matrix-Protein 130 (GM130) in den Exosomenlysaten fehlen, aber in den Zelllysaten vorhanden sind [140].

5.2.7.1. Aliquotierung der Proben

Anhand der Proteinkonzentration, die mittels BCA-Assay bestimmt wurde, konnte berechnet werden, welches Volumen für eine Proteinladung von 6 µg/Tasche notwendig ist. Da pro Probe, bei einem Gel mit 10 Taschen, je zwei Taschen geplant waren, wurde pro Aliquot eine Gesamtmenge von 18 µg Protein geplant, um etwaige Pipettierfehler einzukalkulieren.

Die Proben wurden entsprechend aliquotiert, mit Laemmli-Probenpuffer im Verhältnis 3:1 versetzt, vorsichtig gemischt und bei 95°C für 5 Minuten unter Rotation mit 300 rpm inkubiert. Durch diesen Schritt wurden die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufgelöst [76].

Nach 5 Minuten wurden die Proben für ca. 60 Sekunden mit der Zentrifuge MiniSpin® plus mit 13.000 rpm zentrifugiert und umgehend bei -80°C gelagert.

5.2.7.2. SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE (engl.: sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) wird eine Proteinprobe durch elektrischen Strom in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt [76]. Das besondere hierbei ist, dass durch die Zugabe von SDS die Proteine alle eine negative Ladung erhalten, sodass diese nur nach ihrem Molekulargewicht und nicht nach ihrer Eigenladung aufgetrennt werden [76]. Sie wandern dementsprechend zur Anode [76]. Durch den Zusatz von β -Mercaptoethanol, Dithiothreitol (DTT) oder Dithioerythrit (DTE) ist es möglich, auch Disulfidbrücken der Proteinprobe aufzulösen [76]. Um bei der Detektion das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können, wird zusätzlich noch ein Größenstandard mit bekannten Molekulargewichten aufgetragen [76].

Die Exosomenlysate von Caki-2 WT und Caki-2 Paz sowie deren Zelllysate wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden die Proben bei Raumtemperatur für eine Minute bei 2000 rpm zentrifugiert. Das Elektrophoresegel wurde zusammen mit einem „Buffer Dam“ in die Kammer eingespannt, da nur mit einem Gel pro Western Blot gearbeitet wurde. Um ein Austrocknen des Gels zu verhindern, wurde das Kammersystem zügig mit dem Laufpuffer befüllt und die einzelnen Taschen des Gels mit einer 5 ml-Spritze mit einer dünnen Kanüle vorsichtig jeweils zweimal mit dem umgebenden Laufpuffer gespült, um Gelreste aus den Taschen zu entfernen. Die Beladung der Taschen wurde entsprechend Abbildung 4 durchgeführt, wobei der verwendete Proteinmarker sich zur Detektion von Proteinen im Bereich von 10 bis 180 kDa eignet.

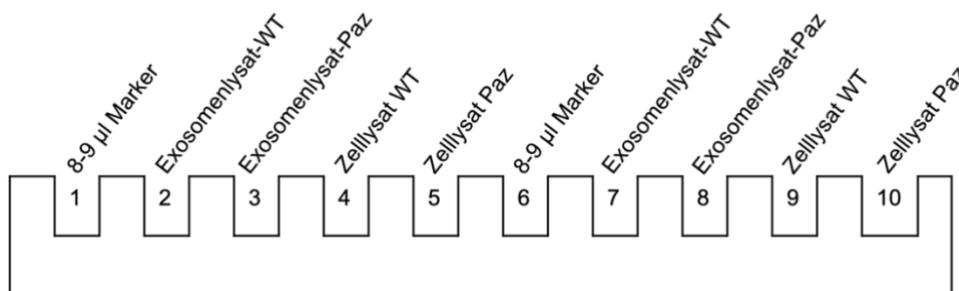


Abbildung 4: Schema der Taschenbeladung der SDS-PAGE
WT= Caki-2 Wildtypzellen, Paz= pazopanibresistente Caki-2 Zellen

Die SDS-PAGE wurde mit einer Spannung von 75 V und einer Stromstärke von 50 mA für 30 Minuten laufen gelassen. Die Elektrophorese wurde danach kurz pausiert, um die Spannung auf 110 V zu erhöhen und dann für weitere 90 Minuten fortgesetzt. Sobald die grüne 10 kDa-Bande des Proteinmarkers den unteren Rand des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt.

Während der 2 Stunden der Gelelektrophorese wurde die PVDF-Blottingmembran (PVDF= Polyvinylidendifluorid) auf ein Format von 9 cm x 7 cm zurechtgeschnitten und durch

einminütiges Schwenken in Methanol und darauffolgendes Waschen in Aqua dest. aktiviert und bis zur Verwendung im Transferpuffer gelagert. Das Aktivieren mit Methanol war aufgrund der stark hydrophoben Eigenschaften der PVDF-Membran erforderlich [222]. Insgesamt wurden für einen Blot sechs Whatman®-Papiere auf eine Größe von 9,5 cm x 7,5 cm geschnitten und ebenfalls im Transferpuffer gelagert.

5.2.7.3. Proteinblotting/ Western Blotting

Die Proteine, die durch die SDS-Page aufgespalten wurden, sollten nun mit Hilfe von elektrischem Strom auf die PVDF-Membran im Western Blotting übertragen werden [223]. Bei der Proteinbindung an die Membran geht das SDS verloren und die Proteine nehmen teilweise ihre ursprüngliche Form wieder ein, sodass sie durch Antikörper bei der darauffolgenden Detektion erkannt werden können [223]. Bei der hier angewandten Methode des Semi-dry Blots gelangt der Transferpuffer im Gegensatz zum Wet-Blot nur über durchtränkte Filterpapiere an das Gel und die Membran [121]. Hierzu wurden zunächst drei der mit Laufpuffer durchtränkten Whatman®-Papiere auf die Elektrodenplatte, die die Anode darstellt, gestapelt, gefolgt von der aktivierten PVDF-Membran, auf die wiederum das Gel und die übrigen 3 Whatman®-Papiere geschichtet wurden. Nach jeder Schicht wurden mit großer Vorsicht und sanftem Druck die zwischen den Lagen befindlichen Luftbläschen aus dem „Blotting-Sandwich“ herausgedrückt, um einen adäquaten und ungestörten Transfer der Proteine auf die Membran zu gewährleisten. Die Kathode wurde aufgesetzt und der Western Blot mit der Einstellung einer konstanten Stromstärke von 125 mA, einer maximalen Spannung von 25 V, sowie einer Leistung von 50 W für eine Stunde laufen gelassen.

Während dieser Zeit wurde Milch 5% in TBST und BSA 5% in TBST angesetzt, wofür jeweils 2,5 g Trockenmilch bzw. BSA in 50 ml TBST mit Hilfe einer Rührmaus auf einem Magnetrührgerät gelöst wurden, da beide zur Blockierung der Membran nach dem Blotting benötigt wurden. Dieser Schritt hatte den Zweck, die übrigen Proteinbindungsstellen der Membran zu blockieren, um weniger unspezifische Signale zu erhalten [222]. Nach Ende des Blottings wurde die Membran für ca. 10 min in TBST gewaschen und dann für 60 Minuten mit BSA 5% in TBST blockiert. Die Membran wurde im Anschluss in 4 kleinere Membranen zerschnitten (siehe Abbildung 5). Eine Schnittlinie wurde horizontal parallel zur Mitte der roten 70 kDa Bande des Proteinmarkers geführt und die zweite Schnittlinie senkrecht dazu durch die Proteinmarkerbanden, die im Gel bei Tasche 6 aufgetragen waren, sodass jede kleine Membran Teile der Markerbande enthielt und keine Proben abgeschnitten wurden.

Die Membran, die für den Antikörper gegen Alix vorgesehen war, wurde für ca. 5 Minuten mit Milch 5% in TBST inkubiert.

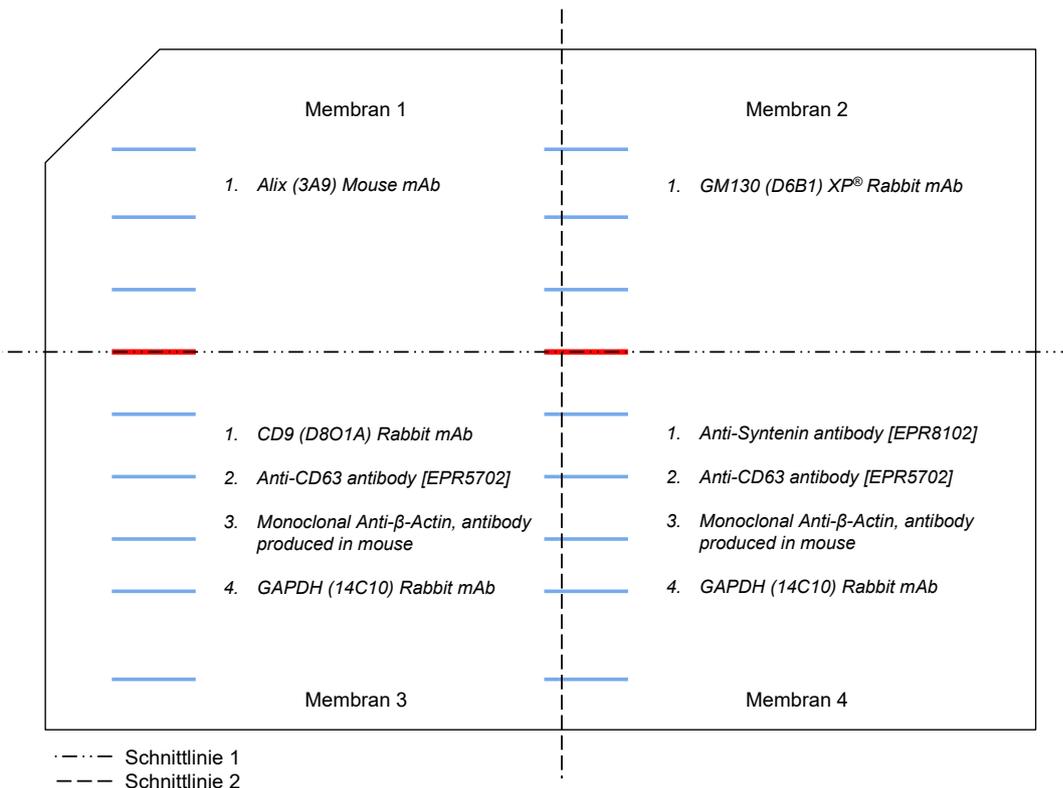


Abbildung 5: Schema der Membran mit Schnittlinien und Antikörperverteilung (die Nummer vor den Antikörpern entspricht der Reihenfolge der Membraninkubation)

5.2.7.4. Inkubation mit dem Primärantikörper

Die verwendeten Antikörper können Tabelle 8 entnommen werden. Für die erste Inkubation wurden die Primärantikörper gegen Alix, GM130, Syntenin und CD9 eingesetzt, wobei pro Membran nur ein Antikörper verwendet wurde. Die Antikörper gegen Alix und GM130 wurden aufgrund des hohen Molekulargewichts auf den Membranen inkubiert, die den Bereich von 70-180 kDa abdecken und die im Folgenden nur noch als Membranen 1 und 2 bezeichnet werden. Die Membranen 3 und 4 bilden Proteine im Bereich von 10-70 kDa ab (siehe Abbildung 5). Diese wurden mit den Primärantikörpern gegen Syntenin und CD9 inkubiert. Die Primärantikörper waren in der Regel im Verhältnis 1:1000 entweder mit BSA 5% in TBST oder Milch 5% in TBST verdünnt. Abweichungen von dieser Verdünnung sind in Tabelle 8 dargestellt. Die Antikörper wurden auf die Membranen gegeben und diese über Nacht auf einem analogen Wippschüttler bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Da die Antikörper nach Inkubation wiederverwendet wurden, wurde gelegentlich vor erneuter Anwendung 1 µl des Primärantikörpers zu der Antikörperverdünnung hinzupipettiert, um eine ausreichende Antikörperaktivität zu erzielen.

Nach der Detektion dieser vier Antikörper wurde auf Membran 3 und 4 CD 63 und danach noch β-Actin inkubiert und detektiert (siehe Abbildung 5). Da der Antikörper β-Actin von der Maus stammt und die vorherigen Antikörper der Membranen 3 und 4 alle vom Kaninchen, war es möglich, β-Actin zu detektieren, ohne die Membran vorher zu strippen. Um Interferenzen mit den Banden anderer Antikörper bei der Detektion von GAPDH zu vermeiden, mussten die

Membranen 3 und 4 vor der Inkubation mit dem Primärantikörper gegen GAPDH „gestrippt“ werden (siehe Punkt 5.2.7.6).

5.2.7.5. Detektion

Zur Detektion mussten die Membranen, die über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert wurden, zunächst gewaschen werden, um die Antikörper, die nicht an die Membran gebunden hatten, zu entfernen, um möglichst wenig unspezifische Signale zu erhalten. Hierzu wurden die Membranen dreimal für jeweils 10 Minuten in TBST auf einem Schüttler gewaschen. Nach diesem Waschschrift wurde der entsprechende Sekundärantikörper auf die Membranen gegeben. Die verwendeten Sekundärantikörper können Tabelle 8 entnommen werden. Die Wahl des Sekundärantikörpers war davon abhängig, von welcher Spezies sich der Primärantikörper ableitet. Wenn der Primärantikörper vom Kaninchen stammte, wurde Anti-Rabbit (engl. für Anti-Kaninchen) gegeben, wenn er von der Maus abstammte, wurde Anti-Mouse (engl. für Anti-Maus) gegeben. Auch die Auswahl der Trägersubstanz des Antikörpers, also BSA 5% in TBST oder Milch 5% in TBST, wurde auf den Primärantikörper abgestimmt. Die Verdünnung der Sekundärantikörper war 1:2000 und die Membranen wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem analogen Wippschüttler damit inkubiert. Danach wurde der Antikörper von den Membranen entfernt und diese wieder dreimal für je 10 Minuten mit TBST gewaschen.

Das Prinzip der Detektion ist die Chemilumineszenz, wobei ein acridanbasiertes Western Blotting-Substrat eingesetzt wurde (siehe Herstellerangaben [274]).

Für die Detektion wurde für die vier Membranen 1 ml Western Blotting-Substrat angesetzt, wobei Bestandteil A im Verhältnis 40:1 mit Teil B gemischt wurde. Die Detektionsschritte wurden im abgedunkelten Raum und mit undurchsichtigen Reaktionsgefäßen durchgeführt. Anschließend wurden die Banden mit Hilfe des Intas ChemoCam Imager ECL visualisiert, wobei die Software ChemoStar Touch v.0.5.63 zur Anwendung kam. Hierbei wurden sequenzielle Aufnahmen mit einer Belichtungszeit von 20 bis 30 Sekunden pro Aufnahme verwendet.

Nach der Detektion wurden die Membranen für ca. 10 min mit TBST gewaschen und danach entweder mit einem anderen Primärantikörper inkubiert oder bei 4°C im Kühlschrank gelagert, wofür entweder TBST (für kürzere Lagerzeiten) oder PBS (wenn die Membranen über einige Tage bei 4 °C gelagert werden sollten) verwendet wurde.

Nachdem alle Antikörper inkubiert und detektiert worden waren, wurden die Membranen inaktiviert und getrocknet, um sie über lange Zeit lagern zu können. Hierzu wurden sie für ca. 10 Sekunden in Methanol geschwenkt und anschließend zwischen zwei Whatman®-Papieren für 60 Minuten getrocknet, die Papiere mit Klebeband an den Rändern fixiert und in Plastikfolie verpackt, um sie bei -20°C speichern zu können.

5.2.7.6. Membrane stripping

Da es zu Überlappungen der Banden und damit zu einer ungenauen Abgrenzbarkeit der einzelnen Proteine kommen kann, wenn diese ein ähnliches Molekulargewicht besitzen und deren Primärantikörper sich von derselben Spezies ableiten, war es für die Darstellung von GAPDH wichtig, die Membranen 3 und 4 vorher zu stripfen. „Stripping“ bezeichnet den Vorgang, bei dem die gebundenen Primär- und Sekundärantikörper von den Membranen entfernt werden [133,146]. Dies geschieht bei einem pH von 2,2 mittels SDS sowie durch die Erhitzung des Strippingpuffers [321].

Beim Membrane Stripping wurden zwei unterschiedliche Varianten durchgeführt. Die Membranen wurden entweder zweimal für je 15 min mit dem Strippingpuffer auf dem Schüttler gewaschen oder der Strippingpuffer zweimal kurz aufgeköcht und im heißen Zustand auf die Membranen gegeben und diese damit so lange auf dem Schüttler inkubiert, bis der Puffer abgekühlt war. Bei beiden Varianten folgten danach zwei Waschschriffe mit PBS für je 5 min, sodass sich der pH bei 7,6 einstellte, worauf zwei Waschschriffe mit TBST für je 10 min folgten. Danach wurden die Membranen mit Milch 5% in TBST und 0,05% Natriumazid blockiert. Das Natriumazid wurde hinzugefügt, um noch verbliebene HRP-Moleküle zu blockieren [23]. Für den Strippingpuffer wurden 200 mM Glycin in Aqua dest. gelöst, 0,1% SDS hinzugefügt, alles gemischt und mittels HCL auf einen pH-Wert von 2,2 titriert. Mit einer Spritze wurde 1% Tween[®] 20 hinzugefügt und mit Aqua dest. aufgefüllt, bis das gewünschte Endvolumen des Strippingpuffers erreicht war.

5.2.8. Functional Assay

Nun sollte überprüft werden, ob die Pazopanibresistenz der Caki-2 Paz-Zellen auf sensitive Caki-2 WT-Zellen über Exosomen übertragen werden kann. Hierzu wurden sowohl die Exosomen des Wildtyps als auch der resistenten Zellen, wie in Unterpunkt 5.2.3 beschrieben, isoliert und in 70 bis 120 µl PBS resuspendiert. Mit Hilfe des BCA-Assays wurde die Konzentration der Exosomen gemessen. Die Caki-2 WT-Zellen sollten mit einer Exosomenkonzentration von 8 µg/ml und 20 µg/ml über 3 Tage stimuliert werden. Die entsprechenden Volumina wurden aus den gemessenen Konzentrationen wie folgt errechnet:

$$FV \cdot FC = IV \cdot IC$$

$$IV = \frac{FV \cdot FC}{IC}$$

$FV = 1000 \mu\text{l}$ (für 12- Well-Platte) bzw. $200 \mu\text{l}$ (für 96- Well-Platte)

$FC = 0,008 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ bzw. $0,02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

$IC =$ in BCA-Assay gemessener Wert

$IV = ?$

Beispielrechnung für die 12-Well-Platte und eine Konzentration von $0,008 \mu\text{g}/\mu\text{l}$:

$$IV (0,008 \mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{1000 \mu\text{l} \cdot 0,008 \mu\text{g}/\mu\text{l}}{\text{gemessene Konzentration der Exosomen}}$$

Formel 7: Exosomenvolumen für $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ in der 12-Well-Platte

FV= Zielvolumen (engl.: final volume), FC= Zielkonzentration (engl.: final concentration), IV= Startvolumen (engl.: initial volume), IC= Startkonzentration (engl.: initial concentration)

Die Berechnung der Volumina für eine Konzentration von $0,02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ in der 12-Well-Platte und für die beiden Konzentrationen für die 96-Well-Platte erfolgten analog zu der Rechnung in Formel 7.

Um eine Beeinflussung der Zellen durch Exosomen aus dem FCS zu verhindern, wurden alle Schritte des Functional Assays mit RPMI+10% ED-FCS+1% PenStrep durchgeführt. Die Antibiose mit Penicillin und Streptomycin war erforderlich, weil die Exosomen in nicht-sterilen Ultrazentrifugenröhrchen isoliert und damit bakteriell besiedelt waren. Die Zellen wurden an Tag 1 des Experiments ausgesät, an Tag 2, 3 und 4 mit Exosomen stimuliert, an Tag 5 mit Pazopanib und DMSO behandelt, und an Tag 8 wurde die Zellviabilität mittels WST-1 gemessen.

5.2.8.1. Zellaussaat in die 12-Well-Platte

Die 12-Well-Platte wurde vorbereitet, indem jeweils $500 \mu\text{l}$ Medium (mit ED-FCS und 1% PenStrep) in 6 Wells vorgelegt wurden. Anschließend wurden die Caki-2 WT aus einer 25 cm^2 -Flasche, wie unter 5.2.1.2 beschrieben, trypsiniert und die Zellen mit dem Zellzählgerät gezählt. Die Zielzellzahl war $3 \cdot 10^4$ Zellen pro $500 \mu\text{l}$ (pro Well ohne vorgelegtes Medium). Bei einer Gesamtzahl von 6 Wells lag also das Endvolumen bei $3000 \mu\text{l}$. Unter Einberechnung von Pipettierfehlern wurden $5000 \mu\text{l}$ angesetzt. Die Zielzellzahl für $5000 \mu\text{l}$ war $3 \cdot 10^5$. Die Berechnung des Volumens des Mediums, zu dem das berechnete Volumen der Zellsuspension pipettiert wurde, war wie folgt:

$$\text{Volumen des Mediums } [\mu\text{l}] = 5000 \mu\text{l} - \text{berechnetes Volumen der Zellsuspension } [\mu\text{l}]$$

Formel 8: Volumen des Mediums zu dem die Zellsuspension im FA pipettiert wurde

Von den $5000 \mu\text{l}$ der Zellsuspension mit $3 \cdot 10^5$ Zellen wurden pro Well $500 \mu\text{l}$ entnommen und die Zellen in das vorgelegte Medium der 12-Well-Platte ausgesät und durch sanftes Schwenken verteilt. Die 12-Well-Platte wurde für 24h im CO_2 -Inkubator inkubiert.

5.2.8.2. Stimulation mit Exosomen in der 12-Well-Platte

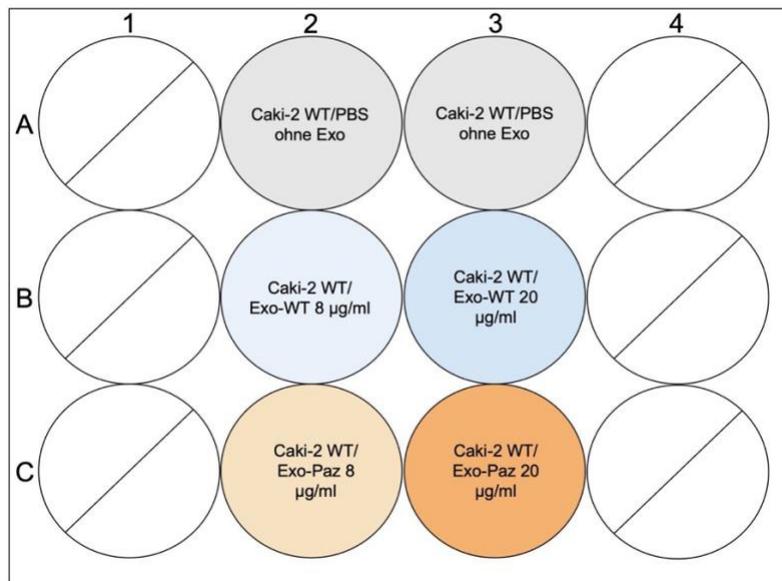


Abbildung 6: Belegungsplan der 12-Well-Platte des Functional Assays
 $3 \cdot 10^4$ Zellen pro Well, Medium: RPMI+10% ED-FCS+1% PenStrep; Exo= Exosomen, Exo-WT= Wildtypexosomen, Exo-Paz= Exosomen der pazopanibresistenten Zellen, PBS ohne Exo= Caki-2 WT-Zellen, die nur mit PBS ohne Exosomen behandelt wurden, Caki-2 WT= Caki-2 Wildtypzellen

In der 12-Well-Platte wurden die Zellen zweimal stimuliert. Die bei -80°C gelagerten Exosomen der WT- und Paz-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und für 60 s bei 4°C und 2000 rpm zentrifugiert. Damit die Konzentration der Exosomen bei der ersten Stimulation an Tag 2 des Functional Assays exakt bei 8 bzw. $20 \mu\text{g/ml}$ lag, wurde, bevor die jeweiligen Volumina an Exosomen in die Wells pipettiert wurden, das Volumen, das hinzugefügt werden sollte, mit einer Pipette entnommen und verworfen. Die Stimulation erfolgte gemäß der Planungsplatte (siehe Abbildung 6). Zwei Wells wurden nur mit PBS ohne Exosomen stimuliert, wobei die Menge des PBS dem höchsten Volumen der Exosomen entsprach, mit dem stimuliert wurde. Die Wildtypexosomen und die Exosomen der pazopanibresistenten Zellen wurden je Konzentration ($8 \mu\text{g/ml}$ und $20 \mu\text{g/ml}$) auf je ein Well gegeben und die Platte durch vorsichtiges Schwenken gemischt.

Bei der 2. Stimulation, die an Tag 3 des Functional Assays stattfand, musste ein Medienwechsel erfolgen. Hierfür wurden aus jedem Well $500 \mu\text{l}$ entnommen, sodass die Zellen mit $500 \mu\text{l}$ bedeckt blieben und nicht austrockneten. Danach wurden sowohl das Medium als auch die Exosomen zu jedem Well pipettiert, sodass wieder ein Endvolumen von $1000 \mu\text{l}$ pro Well erreicht wurde. Das Volumen des Mediums, das pro Well hinzugefügt wurde, berechnete sich wie folgt:

$$\text{Volumen des Mediums } [\mu\text{l}] = 500 \mu\text{l} - \text{Volumen der Exosomen/ des PBS das pro Well zur Stimulation gegeben wurde } [\mu\text{l}]$$

Formel 9: Volumen des Mediums bei Medienwechsel und Stimulation in 12-Well-Platte

5.2.8.3. Zellaussaat in die 96-Well-Platte und Stimulation mit Exosomen

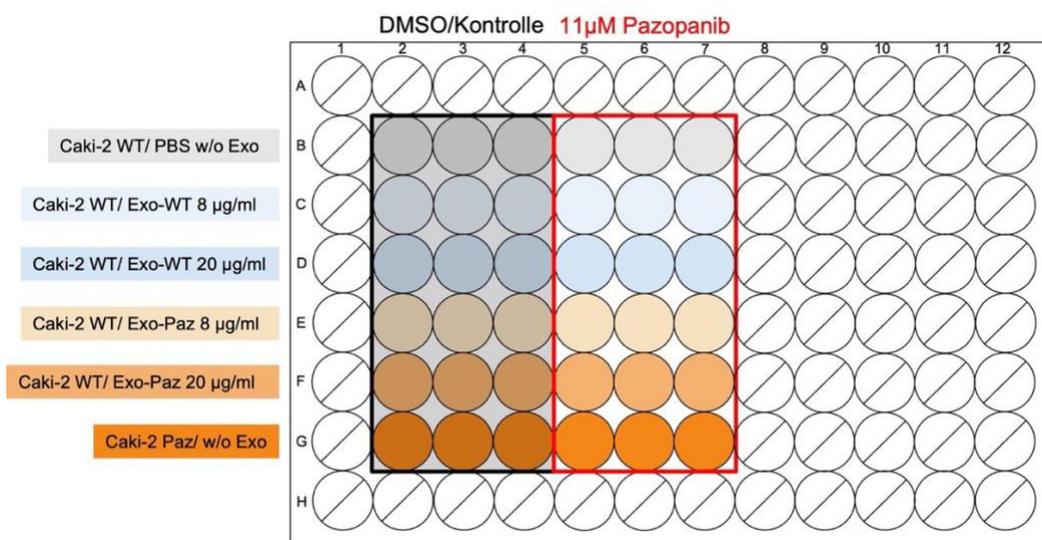


Abbildung 7: Belegungsplan der 96-Well-Platte des Functional Assays
2·10³ Zellen pro Well, Medium: RPMI+10% ED-FCS+1% PenStrep; Exo= Exosomen; Exo-WT= Wildtypexosomen; Exo-Paz= Exosomen der pazopanibresistenten Zellen; PBS w/o Exo= Caki-2 WT-Zellen, die nur mit PBS ohne Exosomen behandelt wurden; Caki-2 WT= Caki-2 Wildtypzellen; Caki-2 Paz/ w/o Exo= Pazopanibresistente Caki-2 Zellen, die nur mit PBS behandelt wurden

Die Zellen wurden aus der 12-Well-Platte wie in 5.2.1.2 beschrieben, an Tag 4 des Assays trypsinisiert, wobei sich lediglich die Volumina unterschieden. Pro Well wurde mit 500 µl PBS gespült, 500 µl Trypsin-EDTA hinzugefügt und jedes Well nach ca. 5 min Inkubation mit 1 ml RPMI+10% ED-FCS + 1% PenStrep blockiert. Nach der Pelletierung wurden die Zellen mit 1 ml Medium resuspendiert und anschließend die Zellzahl bestimmt. Die 96-Well-Platte wurde vor der Trypsinierung bereits mit je 100 µl Medium pro Well vorbereitet, sodass pro Well 2·10³ Zellen entsprechend dem Schema aus Abbildung 7 ausgesät werden konnten. Die Zellen wurden hierbei jedoch nicht mit der Mehrfachdispenserpipette ausgesät, sondern einzeln mit einer Gilsonpipette in die Wells pipettiert, da das Endvolumen der Zellsuspension mit nur 1 ml für diese Pipette zu gering gewesen wäre und die Mehrfachdispenserpipette nur unnötigen Zellstress verursacht hätte.

Bevor die Zellen mit den Exosomen in der 96-Well-Platte stimuliert werden konnten, wurden sie für ca. 30 min im CO₂-Inkubator inkubiert. Danach wurde zunächst aus jedem Well das entsprechende Volumen, mit dem stimuliert werden sollte, entnommen und dann die Exosomen hinzugefügt.

5.2.8.4. Medikamentengabe in der 96-Well-Platte

An Tag 5 des Functional Assays wurden die Zellen mit 11 µM Pazopanib und 0,11% DMSO behandelt. Das Vorgehen war analog zu dem in 5.2.2.1 beschriebenen Procedere.

5.2.8.5. WST-1-Zellviabilitätstest

Nach 72 Stunden der Inkubation mit Pazopanib wurde mit der 96-Well-Platte ein WST-1-Zellviabilitätstest (siehe Punkt 5.2.2.2) durchgeführt. Bei der Auswertung erfolgten verschiedene Normalisierungen der Absorptionen. Die Absorptionen wurden dabei zum einen

gegen die jeweilige interne DMSO-Kontrolle normalisiert, die dieselbe Vorbehandlung erhalten hatte und zum anderen zu den Caki-2 WT, die mit WT-Exosomen behandelt worden waren unter DMSO, wobei die mit 8 µg/ml Paz-Exosomen behandelten Zellen zu den mit 8 µg/ml WT-Exosomen behandelten Zellen unter DMSO normalisiert wurden und die mit 20 µg/ml Paz-Exosomen behandelten Zellen zu jenen mit 20 µg/ml WT-Exosomen behandelten Zellen unter DMSO.

5.2.9. NTA-Assay

Das NTA-Assay (engl.: Nanoparticle Tracking Analysis) ist ein Verfahren, das es ermöglicht, Teilchen mit einer Größe von 30-1000 nm [70] zu vermessen und ihre Konzentration zu bestimmen [59]. Dieses Verfahren diente dem methodischen Nachweis, dass die Größe der isolierten Teilchen im typischen Größenbereich von Exosomen liegt. Hierbei wird ein Laserstrahl durch die Probe gesendet [59]. Die Teilchen bewegen sich aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung und führen zu einer Streuung des Laserstrahls [59]. Das gestreute Licht wird mit einer Kamera aufgenommen und anhand der Geschwindigkeit der verfolgten Teilchen kann eine Software über die Stokes-Einstein-Formel die Größe der Teilchen berechnen [59,70].

Die Softwareversion NTA 3.4 Build 3.4.4 wurde dabei verwendet.

Die Isolation der Exosomen erfolgte wie unter 5.2.3 beschrieben. Die Exosomen wurden jedoch in 2% PFA-PBS gelöst, weil die Untersuchung erst 5 Tage nach der Isolation stattfinden konnte. Für das NTA-Assay wurden die Proben der Caki-2 WT- und Caki-2 Paz-Zellen im Verhältnis 1:100, 1:500 und 1:1000 mit PBS verdünnt. Bei der Untersuchung wurde zunächst die Probenkammer mit ca. 2 ml PBS gespült, sodass keine Luftblasen mehr enthalten waren und anschließend die Kammer mit der verdünnten Probe befüllt. Es erfolgten mehrere Messungen, für die mit der 1-ml-Spritze nach und nach mehr Probenmaterial injiziert wurde, sodass sich die Flüssigkeit bewegte und nicht nur die Teilchen einer Stelle gemessen wurden. Der Zielbereich war eine Verdünnung, bei der pro Rahmen in etwa 20 bis 120 Partikel vorlagen. Um später einordnen zu können, ob etwaige Konzentrationsunterschiede der Exosomen auf Unterschiede in der Zellzahl oder in der Exosomenproduktion bei gleicher Zellzahl zurückzuführen sind, wurden je Zelllinie die Zellen der beiden Triple flasks, deren Exosomen für das NTA vorgesehen waren, trypsinisiert und gezählt.

5.2.10. Uptake-Assay

Zum Nachweis der Aufnahme der Exosomen erfolgte das Uptake-Assay unter Verwendung der Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie. Die Exosomen, das Zytoskelett und die Zellkerne wurden mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert.

5.2.10.1. Aussaat der Zellen in 4-Well-Objektträger

Bei den verwendeten Objektträgern handelte es sich um Kammerobjektträger mit jeweils 4 Wells. Die Caki-2 WT-Zellen wurden, wie in 5.2.1.2 beschrieben, trypsinisiert und in je 2 Well

pro Objektträger ausgesät. Insgesamt wurden 6 Objektträger genutzt, wobei in jeweils 3 davon $2 \cdot 10^4$ Zellen und in die übrigen 3 jeweils $3 \cdot 10^4$ Zellen pro Well ausgesät wurden. Die Objektträger wurden bis zum nächsten Tag im CO_2 -Inkubator gelagert. Um eine Verunreinigung durch fremde Exosomen zu vermeiden, wurde auch bei diesem Experiment RPMI+10% ED-FCS+1% PenStrep verwendet.

5.2.10.2. Färbung der Exosomen und Inkubation der Caki-2 WT-Zellen

Die Exosomen wurden auf Eis aufgetaut und für ca. 1 min bei 500 G und 4°C in der Zentrifuge 5804 R zentrifugiert. Alle Schritte der Färbung erfolgten auf Eis und unter der abgedunkelten Werkbank. Zunächst wurden zwei 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit jeweils 500 μl Diluent C befüllt. In das erste Gefäß wurde die Exosomenprobe hinzupipettiert (300 μl) und in das zweite Gefäß 300 μl PBS als Kontrolle. Zusätzlich wurden in zwei weitere 1,5 ml-Reaktionsgefäße jeweils 500 μl Diluent C und 2 μl PKH26 gefüllt. Auf Eis gelagert wurde das PKH26-Diluent C-Gemisch für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die mit Diluent C versetzten Proben in zwei 5 ml-Reaktionsgefäße überführt und in jedes Reaktionsgefäß wurde die PKH26-Mischung hinzugegeben. Während der darauffolgenden 5 min der Inkubation wurden die Proben mit dem Farbstoff gelegentlich resuspendiert, um eine gleichmäßige Färbung der Exosomen zu erreichen. Die stabile rote Membranfärbung der Exosomen wurde durch die Einlagerung des aliphatischen Kohlenwasserstoffanteils des stark fluoreszierenden und lipophilen Farbstoffs PKH26 in die Membran erreicht [212,295]. Der Schritt der Färbung wurde nach 5 min durch die Zugabe von 1,3 ml ED-FCS unterbrochen und das Endvolumen von 2,6 ml je Reaktionsgefäß in Proteinkonzentrationsröhrchen überführt. Diese Konzentrationsröhrchen wurden bei 3000 G und 4°C für 30 min zentrifugiert, sodass sich ein Exosomen-, bzw. PBS-Überstand im oberen Kammersystem bildete. Dieser Überstand wurde entnommen und in zwei neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße gefüllt. Durch diesen Schritt wurde der Farbstoff, der nicht an die Exosomen gebunden hatte, entfernt, um eine unspezifische Zellfärbung zu verhindern. Die Konzentration der gefärbten Exosomen wurde anschließend im BCA-Assay ermittelt.

Aus den Wells der Objektträger wurde das im BCA-Assay errechnete Volumen der gefärbten Exosomen bzw. des PBS an Medium entnommen, sodass anschließend die gefärbten Exosomen sowie die PBS-Kontrolle entsprechend Abbildung 8 in die Wells pipettiert wurden. Als PBS-Kontrolle wurden 2 Objektträger eingesetzt (einmal mit $2 \cdot 10^4$ und einmal mit $3 \cdot 10^4$ Zellen), wobei jeweils die PBS-Volumina den höchsten Exosomenvolumina, die bei der jeweiligen Zellzahl zur Anwendung kamen, entsprachen (15 μl und 30 μl bei $2 \cdot 10^4$ Zellen/Well sowie 40 μl und 60 μl bei $3 \cdot 10^4$ Zellen/Well). Pro Zellzahl wurden 4 verschiedene Exosomenvolumina appliziert (1,5 μl , 5 μl , 15 μl und 30 μl bei $2 \cdot 10^4$ Zellen/Well sowie 10 μl , 20 μl , 40 μl und 60 μl bei $3 \cdot 10^4$ Zellen/Well, siehe Abbildung 8) um die beste Kombination aus Zellzahl und Exosomenvolumen herauszufinden. Anschließend wurden die Objektträger über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 im CO_2 -Inkubator gelagert.

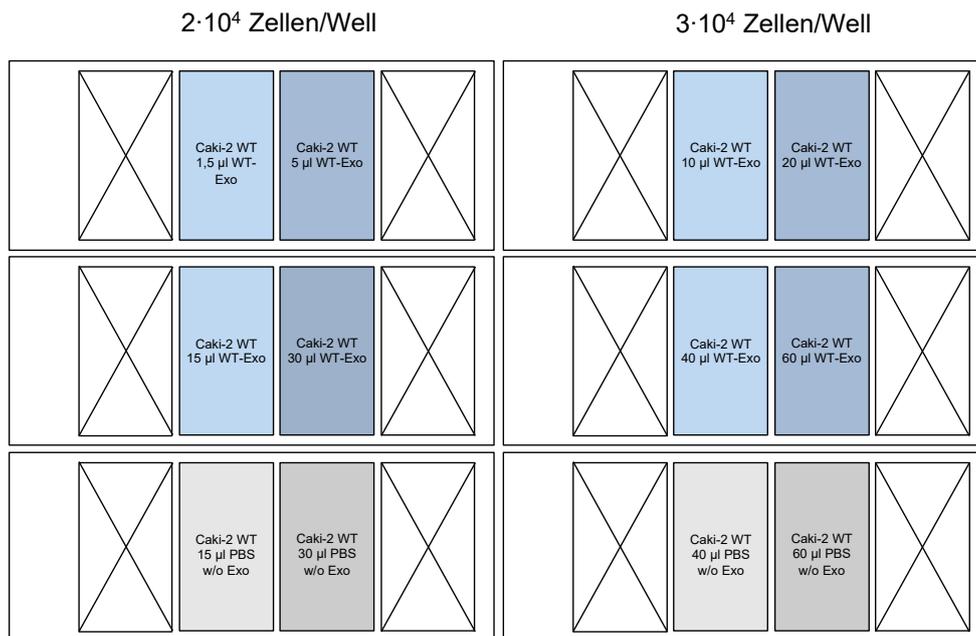


Abbildung 8: Belegungsschema der Objektträger bei Uptake-Assay
 3 · 10⁴ Zellen/Well (rechts) bzw. 2 · 10⁴ Zellen/Well (links) in RPMI+ 10% ED-FCS+ 1% PenStrep; WT-Exo= Exosomen von Caki-2 WT, PBS w/o Exo= PBS ohne Exosomen (Kontrolle)

5.2.10.3. Fixierung der Zellen und Färbung mit Phalloidin

Am nächsten Tag wurde zunächst das komplette Medium aus den Wells der Objektträger entnommen und die Wells dann dreimal mit kaltem PBS gespült. Nach diesen Waschschritten erfolgte die Gabe von 1 ml 4%-PFA-PBS pro Well und die anschließende Inkubation mit dem 4% PFA-PBS für 30 min zur Fixierung der Zellen. Alle Schritte erfolgten im abgedunkelten Raum und auf Eis. Die Wells wurden im Anschluss dreimal mit kaltem PBS gespült und danach mit 600 µl PBS mit 0,1% Triton X (PBST) für 10 min inkubiert, um die Zellen zu permeabilisieren [37]. Anschließend wurden die Wells wieder dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Die Blockade mit 600 µl 3% BSA in PBST pro Well für 45 min erfolgte, um unspezifische Bindungen zu reduzieren [124]. Nach diesem Schritt konnte die Fluoreszenzmarkierung des Zytoskeletts erfolgen. Hierzu wurden pro Well 160 µl Alexa Fluor™ 488 Phalloidin gegeben und die Objektträger damit für 60 min inkubiert. Der Farbstoff Alexa Fluor™ 488 Phalloidin wurde hierzu im Verhältnis 1:1000 mit Dako Antibody Diluent verdünnt. Fluoreszenzmarkiertes Phalloidin bindet mit hoher Affinität an filamentöses Aktin (F-Aktin) [309] und ermöglicht damit die Visualisierung des Zytoskeletts der Zellen, da Actin einen wichtigen Bestandteil des Zytoskeletts darstellt [210]. Danach erfolgten wieder drei Waschschrritte mit kaltem PBS für 5 min und eine kurze Spülung mit destilliertem Wasser. Um die Exosomen später besser lokalisieren zu können, wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt, das fluoreszierende Komplexe mit AT-reichen Regionen der DNA im Zellkern bildet [131]. Hierfür wurde Mounting Medium mit DAPI verwendet, das das Ausbleichen der Proben verhindern soll [286]. Die Objektträger wurden mit Deckgläsern versehen und diese versiegelt,

um ein Austrocknen oder Verrutschen zu verhindern. Die Proben konnten so bei 4°C im Dunkeln bis zum Zeitpunkt der Mikroskopie gelagert werden.

5.2.10.4. Mikroskopie

Mit Hilfe des Mikroskops LSM 780 wurden die Objektträger mikroskopiert und photodokumentiert. Die dazu verwendeten Kanäle und Wellenlängen können Tabelle 15 entnommen werden. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte im Anschluss mit der Software Zen 2012 Lite sowie der Software ImageJ.

Kanal	1	2	3	4
Kanalfarbe	blau	grün	weiß	rot
Anregungswellenlänge [nm]	405	561		561
Emissionswellenlänge [nm]	447	591		623

Tabelle 15: Einstellungen der Kanäle und der Wellenlängen bei der Mikroskopie

5.2.10.5. Statistische Auswertung und Programme

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels Microsoft® Excel Version 16.66.1. Aus den technischen Replikaten wurde jeweils der Mittelwert berechnet und anschließend je nach Fragestellung der Mittelwert der verschiedenen biologischen Replikate sowie die dazugehörigen Standardabweichungen und Standardfehler ermittelt. Es wurden T-Tests für unabhängige Gruppen und gleiche Varianzen berechnet, wobei $p < 0,05$ als statistisch signifikant gewertet wurde.

6. Ergebnisse

6.1. Nachweis der Resistenz

6.1.1. Zellkultur

Für die Versuche wurden Caki-2 Wildtypzellen (WT) und Caki-2 Zellen mit Pazopanibresistenz (Paz) verwendet. Die Caki-2 Paz wurden von unserer Forschungsgruppe etabliert, indem sie kontinuierlich über 3 Monate hinweg mit Pazopanib in einer Konzentration von 11 μM behandelt wurden, wobei eine Resistenz auftrat. Mikroskopisch unterscheiden sich die Caki-2 Paz von den Caki-2 WT in 40-facher Vergrößerung unter anderem durch eine stärkere intrazelluläre Vesikelbildung sowie intrazellulär erkennbare Kristalle (siehe Abbildung 9).

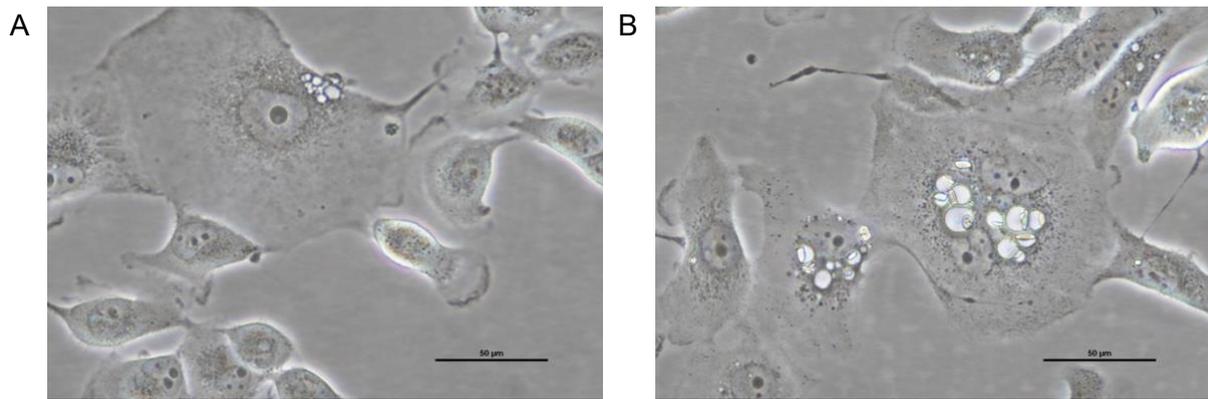


Abbildung 9 Mikroskopiebilder in 40-facher Vergrößerung
 A) Caki-2 WT P. 56; B) Caki-2 Paz P. 56 mit intrazellulär sichtbaren Kristallen

6.1.2. Resistenztestung mittels Pazopanibkonzentrationsreihe

Um zu überprüfen, ob die Caki-2 Paz tatsächlich resistent gegen das Medikament sind, wurden pro Zelllinie jeweils zwei 25 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert, sodass die Versuche jeweils in 2 biologischen Replikaten durchgeführt werden konnten, wobei die Caki-2 Paz in den Kulturflaschen unter permanenter Behandlung mit 11 µM Pazopanib standen. 72 h nach der Pazopanibgabe in der 96-Well-Platte wurde der WST-1 Zellviabilitätstest durchgeführt. Bei der Auswertung wurde der Mittelwert der Absorptionen der 6 biologischen Replikate der Versuche aus Passage 60/61 (Versuche 1, 2, 5 und 6) inklusive der Standardfehler sowie der T-Tests berechnet und die Absorptionswerte wurden zu den Caki-2 WT unter DMSO normalisiert.

Bei der Betrachtung der Viabilitäten aller Versuche aus Passage 60/61 (Abbildung 10) fällt auf, dass die Caki-2 Paz eine signifikant höhere Viabilität insbesondere unter DMSO (T-Test: $p=0,0286$) und den niedrigeren Pazopanibkonzentrationen (T-Test 3 µM: $p=0,0021$; 6 µM: $p=0,0002$; 11 µM: $p=0,0052$) gegenüber den Caki-2 WT aufweisen. Bei Konzentrationen unterhalb der 11 µM führt die Pazopanibresistenz der Zellen zu einem Anstieg der Viabilität um 22% bis maximal 26% gegenüber den Caki-2 WT unter DMSO. Im direkten Vergleich zeigt die Viabilitätskurve der WT-Zellen eine andere Dynamik als die der resistenten Zellen und stabilisiert sich unter den hohen Pazopanibkonzentrationen (14 µM, 18 µM und 20 µM) bei Werten zwischen 34 und 43%, wohingegen die Kurve der Caki-2 Paz-Zellen bei 20 µM nur noch bei 16% liegt, wobei die Unterschiede nicht signifikant sind (T-Test 14 µM: $p=0,5762$; T-Test 18 µM: $p=0,4306$; T-Test 20 µM: $p=0,1490$).

Neben diesen 4 Versuchen gab es noch zwei weitere Versuche (Versuch 3 und 4 siehe Abbildung 31, Abbildung 32 und Abbildung 33), die jedoch getrennt ausgewertet wurden, da in diesen Versuchen höhere Passagen (62 und 63) verwendet wurden, wobei auffiel, dass die Resistenz mit steigender Passage abnahm, sodass sich die Zelllinien sowohl in ihrer Viabilität unter 11 µM Pazopanib (T-Test: $p=0,46$) als auch in der IC50 (T-Test: $p=0,61$) nicht mehr signifikant unterschieden (siehe Abbildung 32 und Abbildung 33). Die Viabilitäten unterschieden sich nur bei 3 µM, 6 µM und 18 µM signifikant (T-Test DMSO: $p=0,0910$; 3 µM: $p=0,013$; 6 µM: $p=0,0020$; 14 µM: $p=0,0980$; 18 µM: $p=0,0447$; 20 µM: $p=0,0594$; siehe

Abbildung 31). Um zu überprüfen, ob diese Resistenzabnahme in Abhängigkeit vom Anstieg der Passage auftritt und somit bei niedrigeren Passagen nicht vorhanden ist, wurden deshalb erneut Zellen der Passage 59 aufgetaut, sodass die Versuche 5 und 6 mit Zellen der Passage 60 und 61 durchgeführt wurden. Bei Versuch 5 und 6 wurde jedoch nur ein biologisches Replikat pro Versuch verwendet. Da unter 25 µM Pazopanib bei Versuch 6 eine falsch hohe Absorption durch Kristalle im Medium gemessen wurde, wurde bei dem hier gezeigten Mittelwert diese Konzentration wegen des Artefakts aus dem Graphen entfernt (siehe Abbildung 10).

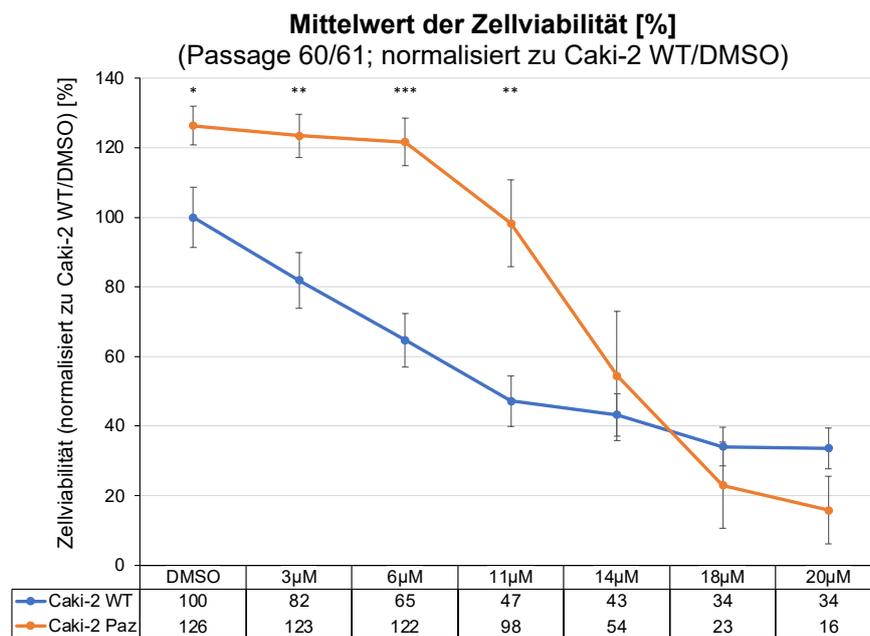


Abbildung 10 Mittelwerte der Zellviabilität (P. 60/61) der Caki-2 WT im Vergleich zu Caki-2 Paz (normalisiert zu Caki-2 WT unter DMSO) unter 0,25% DMSO und Pazopanib (3 µM, 6 µM, 11 µM, 14 µM, 18 µM, 20 µM) mit Standardfehlern; Mittelwert je Konzentration aus je 6 biologischen und je 3 technischen Replikaten (Versuch 1, 2 sowie 5 und 6); T-Tests zum Vergleich der Viabilität der resistenten Zellen mit der Viabilität der sensitiven Zellen (*0,01≤p<0,05; **0,001≤p<0,01; ***p<0,001)

6.1.3. Zellviabilität unter 11 µM Pazopanib

Bei den Mittelwerten der Viabilitäten der beiden Zelllinien (normalisiert zu Caki-2 WT unter DMSO) unter 11 µM Pazopanib wurden die Viabilitäten aus Versuch 1, 2, 5 und 6, sowie die Viabilität eines biologischen Replikats aus dem Vorversuch zu den Resistenztests, bei dem die Zellen lediglich mit 11 µM Pazopanib und 0,11% DMSO behandelt wurden, anstatt mit den sonst verwendeten sieben verschiedenen Pazopanibkonzentrationen, eingerechnet (siehe Abbildung 11). Die Caki-2 WT unterscheiden sich unter der Behandlung mit 11 µM Pazopanib mit einer Viabilität von 48,9% gegenüber der Viabilität der Caki-2 Paz von 96,5% signifikant mit einem p-Wert von 0,0022.

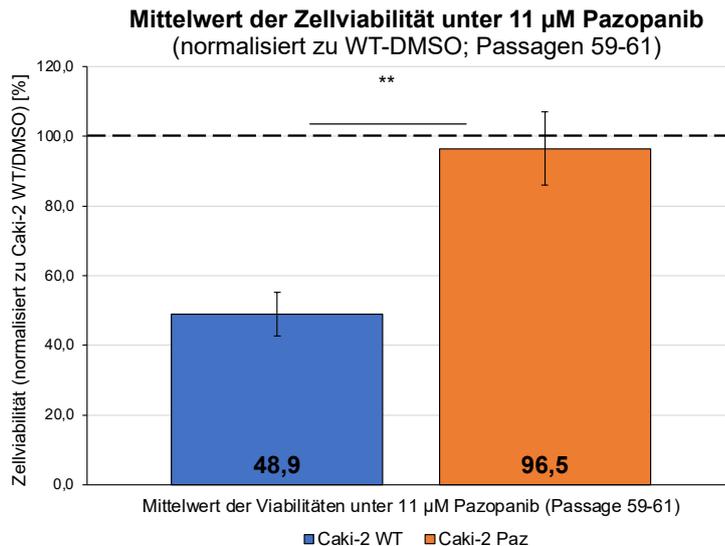


Abbildung 11 Mittelwert der Zellviabilität unter 11 µM Pazopanib (P. 59-61) (normalisiert zu Caki-2 WT unter DMSO (gestrichelte Linie bei 100%)) mit Standardfehlern; Mittelwert der Viabilitäten aus 7 biologischen Replikaten mit je 3 technischen Replikaten; T-Test: $p=0,0022$

6.1.4. IC50 der Caki-2 WT und Caki-2 Paz

Anhand der gemessenen Absorptionen und den daraus abgeleiteten Viabilitäten wurde die IC50 beider Zelllinien errechnet. Aus den IC50-Werten der einzelnen Versuche mit Passage 60/61 (6 biologische Replikate pro Zelllinie) wurde im Anschluss ein Mittelwert gebildet (Abbildung 12). Die errechnete IC50 lag für Caki-2 WT bei 11,1 µM und für Caki-2 Paz bei 16,1 µM Pazopanib ($p=0,027$). Damit wurde der IC50 für CAKI-2 WT aus den Voruntersuchungen bestätigt.

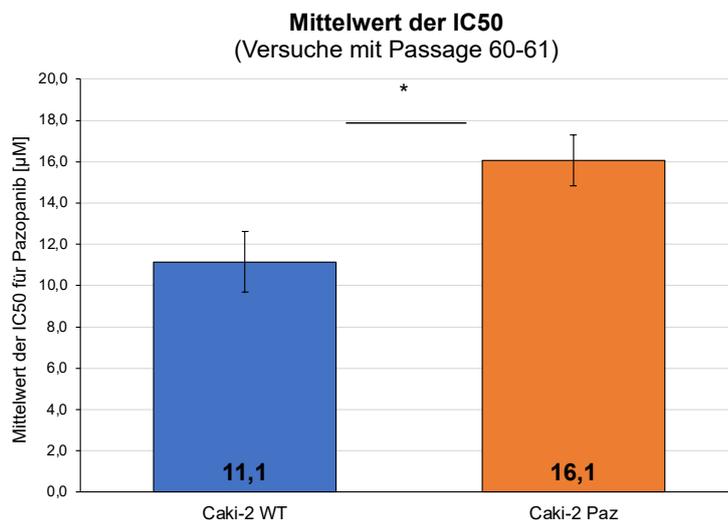


Abbildung 12 Mittelwert der IC50 für die Zellen Caki-2 WT und Caki-2 Paz (aus 6 biologischen Replikaten; Passage 60 und 61) für Pazopanib mit Standardfehlern; T-Test: $p=0,027$

6.2. Exosomenisolation

Insgesamt wurden 11 Exosomenisolierungen durchgeführt (Tabelle 16). Da für die NTA-Messungen nur zwei Triple flasks je Zelllinie benötigt wurden, wurde bei der Isolation das Medium so aufgeteilt, dass statt einem Pellet zwei Pellets je Zelllinie entstanden sind, sodass

die Exosomen der Caki-2 Paz noch für den Western Blot und die Exosomen von Caki-2 WT für den Uptake Assay genutzt werden konnten.

Zweck der Exosomenisolation	Zelllinie/ Passage (p)	Anzahl der Triple Flasks	Konzentration der Exosomen (aus BCA-Assay)
Western Blot	Caki-2 WT/ p60	3	1,27 µg/µl
	Caki-2 Paz/ p62	2	1,81 µg/µl
Western Blot 2	Caki-2 Paz/ p64	3	0,54 µg/µl
Uptake Assay*	Caki-2 WT/ p62	2	44,48 µg/µl
Uptake-Assay*	Caki-2 WT/ p61	4	
Functional Assay 1	Caki-2 WT/ p63	4	1,39 µg/µl
	Caki-2 Paz/ p63	4	1,20 µg/µl
Functional Assay 2	Caki-2 WT/ p60	4	1,14 µg/µl
	Caki-2 Paz/ p60	4	1,10 µg/µl
Functional Assay 3	Caki-2 WT/ p57	4	0,96 µg/µl
	Caki-2 Paz/ p57	4	1,30 µg/µl
NTA	Caki-2 WT/ p62	2	Siehe Punkt 6.3.3.1
	Caki-2 Paz/ p62	2	Siehe Punkt 6.3.3.2

Tabelle 16 Auflistung der Exosomenisolationen

*beim Uptake-Assay wurden die Exosomen vor dem BCA-Assay mit PKH26 gefärbt und die Reaktion mittels ED-FCS gestoppt, sodass die Proteinkonzentration durch das FCS deutlich ansteigt

6.3. Qualitätskontrolle der Exosomenisolation

6.3.1. BCA-Assay zur Berechnung der Taschenladung für den Western Blot

Bevor die SDS-Page und der Western Blot durchgeführt werden konnten, musste die Konzentration der einzelnen Proben ermittelt werden (siehe Tabelle 17). Ausgehend von diesen Konzentrationen konnte anschließend das Volumen berechnet werden, das einer Taschenladung von 6 µg Protein entspricht. Hierzu wurde der BCA-Assay genutzt (siehe Abbildung 37).

Probentyp	Errechnete Konzentration anhand der Gleichung aus den Standardkurven [µg/ml]
Exosomen/ Caki-2 WT	1273,9 µg/ml
Exosomen/ Caki-2 Paz	1810,8 µg/ml
Zellysat/ Caki-2 WT	1345,3 µg/ml
Zellysat/ Caki-2 Paz	1301,7 µg/ml

Tabelle 17 Konzentrationen der zum Western Blot verwendeten Proben

6.3.2. SDS-Page und Western Blot (WB)

Zur Qualitätskontrolle diente der Western Blot (siehe Abbildung 13 (Western Blot 3) mit weiteren Darstellungen in Abbildung 36). Hierbei wurden als exosomale Marker Alix, Syntenin, CD9 und CD63 eingesetzt. Da Proteine des Golgi-Apparats normalerweise nicht in Exosomen gefunden werden, diente GM-130 als Marker für eine Kontamination der exosomalen Proben durch Zellbestandteile.

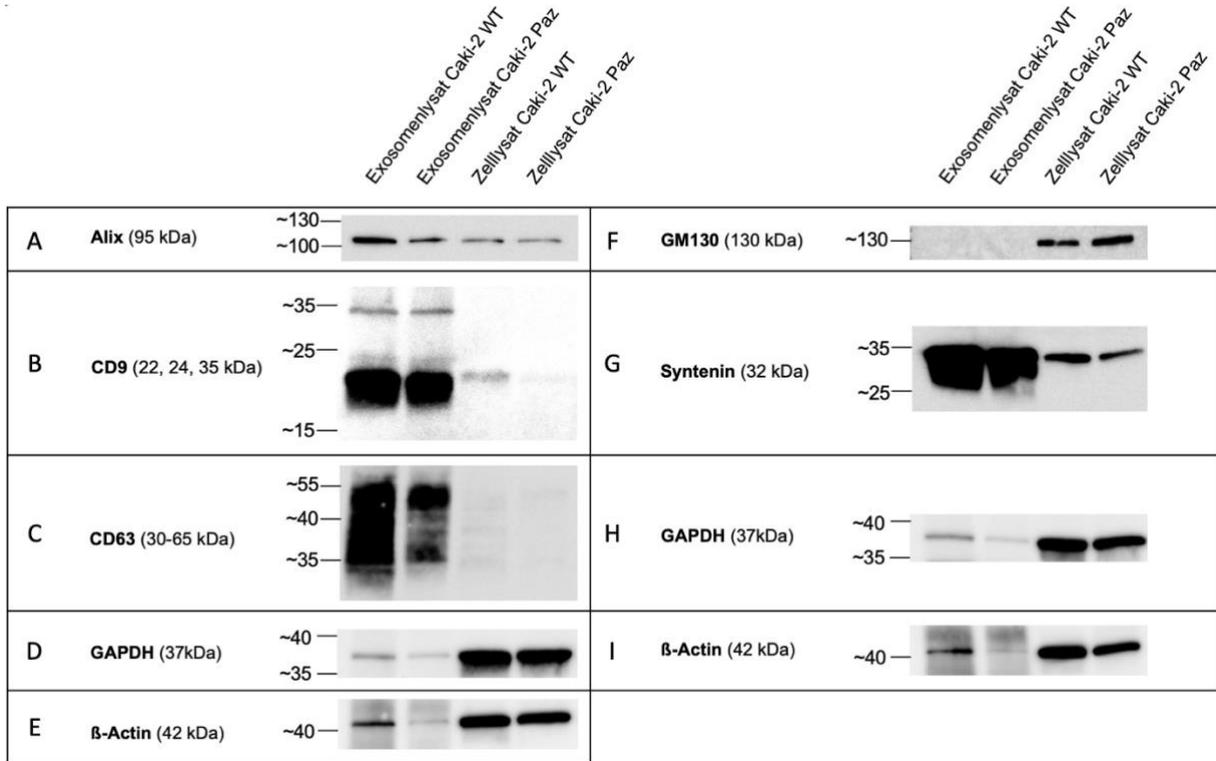


Abbildung 13 Western Blot 3 zum Nachweis der exosomalen Marker

Ladung: 6 µg Protein/Tasche mit Zell- und Exosomenlysaten von Caki-2 WT und Caki-2 Paz; A) Nachweis des Exosomenmarkers Alix; B) Nachweis des Exosomenmarkers CD9; C) Nachweis des Exosomenmarkers CD63; D) Ladekontrolle mit GAPDH für Membran 1 und Membran 3; E) Ladekontrolle mit β-Actin für Membran 1 und Membran 3; F) Nachweis des Zellmarkers GM-130 in Zelllysaten; G) Nachweis des Exosomenmarkers Syntenin; H) Ladekontrolle mit GAPDH für Membran 2 und Membran 4; I) Ladekontrolle mit β-Actin für Membran 2 und Membran 4

Lediglich in den Zelllysaten waren Banden für GM-130 zu erkennen (siehe Abbildung 13 F). In allen Lysaten konnte Alix nachgewiesen werden, wobei die stärkste Bande bei dem Exosomenlysat der Caki-2 WT zu sehen war (siehe Abbildung 13 A). Der exosomale Marker Syntenin war in allen Proben vorhanden, jedoch mit einer deutlich stärkeren Expression in den Exosomenlysaten beider Zelllinien (siehe Abbildung 13 G). CD9 ebenso wie CD63 waren lediglich in den Exosomenlysaten vorhanden (Abbildung 13 B und C). Das Tetraspanin CD9 ist mit einer schwachen Bande auch im Zelllysat der Caki-2 WT sichtbar.

Mit Hilfe von GAPDH und β-Actin wurde die Ladung der Taschen miteinander verglichen, wobei mehr Protein bei den Zelllysaten im Vergleich zu den Exosomenlysaten geladen war (siehe Abbildung 13 D, E, H und I).

Insgesamt wurden drei Western Blots durchgeführt. Im ersten WB wurden zur Etablierung nur Lysate von Wildtypzellen und Wildtypexosomen verwendet (siehe Abbildung 34). Der zweite

Western Blot musste wiederholt werden, da die Caki-2 Paz-Zellen aufgrund einer Fehllieferung versehentlich mit RPMI ohne L-Glutamin kultiviert worden waren, weshalb die Zellen in den Triple flasks nicht adäquat wuchsen und somit zu wenig Exosomen generiert wurden (siehe Abbildung 35).

6.3.3. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Neben dem Western Blotting wurde als zweiter Nachweis, dass die Exosomenisolation erfolgreich war, das NTA-Assay durchgeführt, in dem neben der Größe der Exosomen auch deren Konzentration gemessen wurde. Das Exosomenpellet wurde hierfür im letzten Schritt der Exosomenisolation in PBS mit 2% Paraformaldehyd resuspendiert, um die Probe länger lagern zu können. Von den drei verwendeten Verdünnungen sind hier nur die Messungen der 1:500 und 1:1000 Verdünnung aufgeführt, da bei 1:100 das Hintergrundrauschen zu groß und damit die Messung zu ungenau war. Um beurteilen zu können, ob die im NTA gemessenen Konzentrationsunterschiede zwischen den beiden Exosomenproben auf unterschiedliche Zellzahlen in den Triple flasks oder auf eine gesteigerte oder verminderte Produktion der Exosomen bei ähnlicher Zellzahl zurückzuführen sind, wurden die Triple flasks trypsiniert und mit Hilfe des LUNA-Zellzählgeräts die Zellzahlen bestimmt. Die mittlere Zellzahl pro Triple Flask (Mittelwert aus 2 Triple flasks je Zelllinie) lag für die Caki-2 WT bei $2,45 \cdot 10^7$ Zellen und für die Caki-2 Paz bei $2,60 \cdot 10^7$ Zellen, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zellzahlen bestand ($p=0,83$).

6.3.3.1. Größe und Konzentration der Exosomen von Caki-2 WT

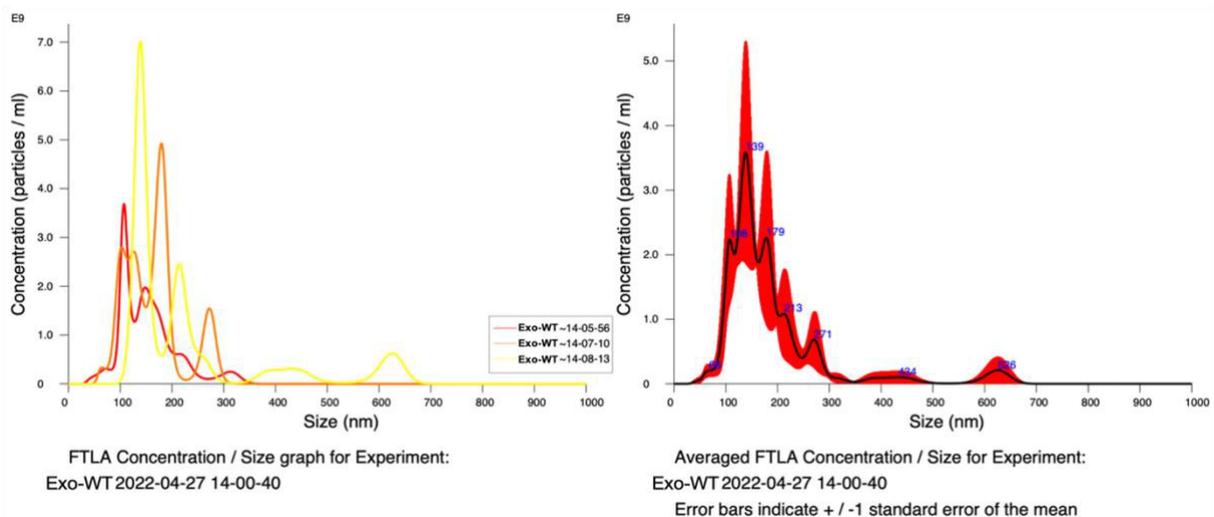


Abbildung 14 NTA-Assay der Exosomen von Caki-2 WT (Verdünnung 1:1000)
links: Einzelmessungen; rechts Mittelung der 3 Messungen

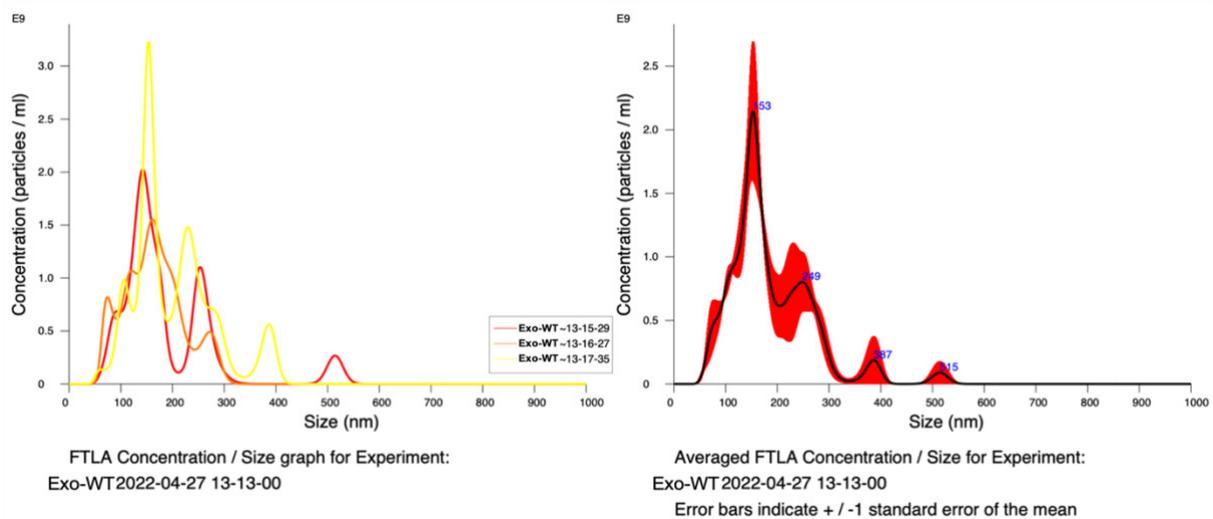


Abbildung 15 NTA-Assay der Exosomen von Caki-2 WT (Verdünnung 1:500)
links: Einzelmessungen; rechts Mittelung der 3 Messungen

Der größte Peak der Kurve der Exosomen der Caki-2 WT liegt bei einer Probenverdünnung von 1:1000 bei 139 nm (vgl. Abbildung 14), was sich auch im Modalwert der Partikelgröße von 141,9 +/- 20,9 nm widerspiegelt (siehe Tabelle 18). Bei einer Verdünnung von 1:500 lag der höchste Peak der Exosomen der Caki-2 WT bei 153 nm (Abbildung 15) und der Modalwert bei 152,5 nm +/- 5,4 nm (Tabelle 18). Die Konzentrationen betragen für die Verdünnung 1:1000 $3,40 \cdot 10^{11} \pm 5,29 \cdot 10^{10}$ Partikel/ml und für die Verdünnung 1:500 $2,21 \cdot 10^{11} \pm 2,48 \cdot 10^{10}$ Partikel/ml (siehe Tabelle 18).

Zelllinie/ Verdünnung	Modalwert der Partikelgröße +/- Standardfehler [nm]	Konzentration +/- Standardfehler [Partikel/ml]
Caki-2 WT/ 1:1000	141,9 +/- 20,9 nm	$3,40 \cdot 10^{11} \pm 5,29 \cdot 10^{10}$ Partikel/ml
Caki-2 WT/ 1:500	152,5 +/- 5,4 nm	$2,21 \cdot 10^{11} \pm 2,48 \cdot 10^{10}$ Partikel/ml

Tabelle 18 NTA-Messergebnisse der Exosomen der Caki-2 WT

6.3.3.2. Größe und Konzentration der Exosomen von Caki-2 Paz

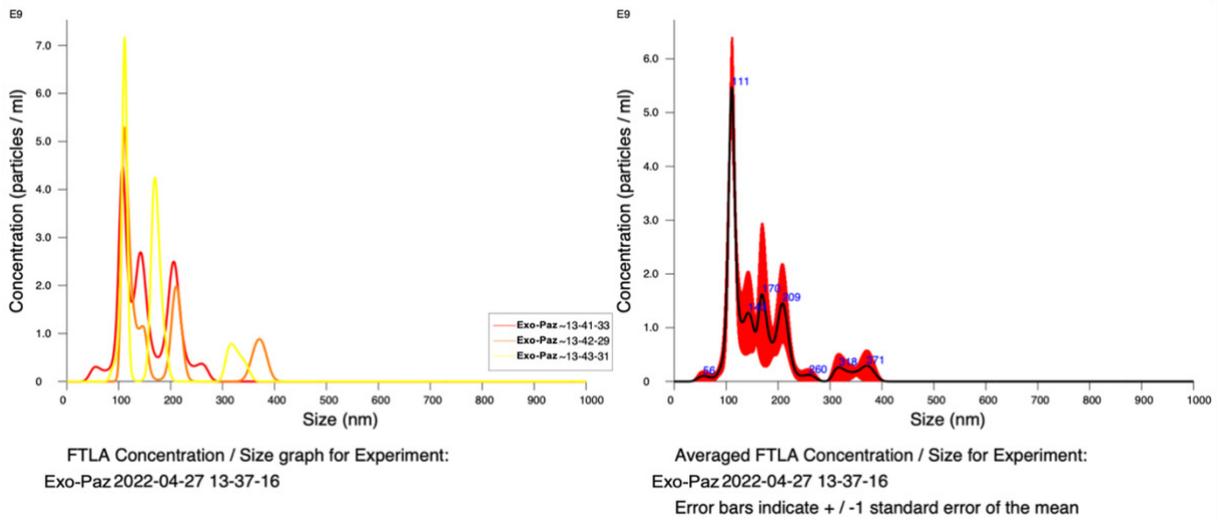


Abbildung 16 NTA-Assay der Exosomen von Caki-2 Paz (Verdünnung 1:1000)
links: Einzelmessungen; rechts Mittelung der 3 Messungen

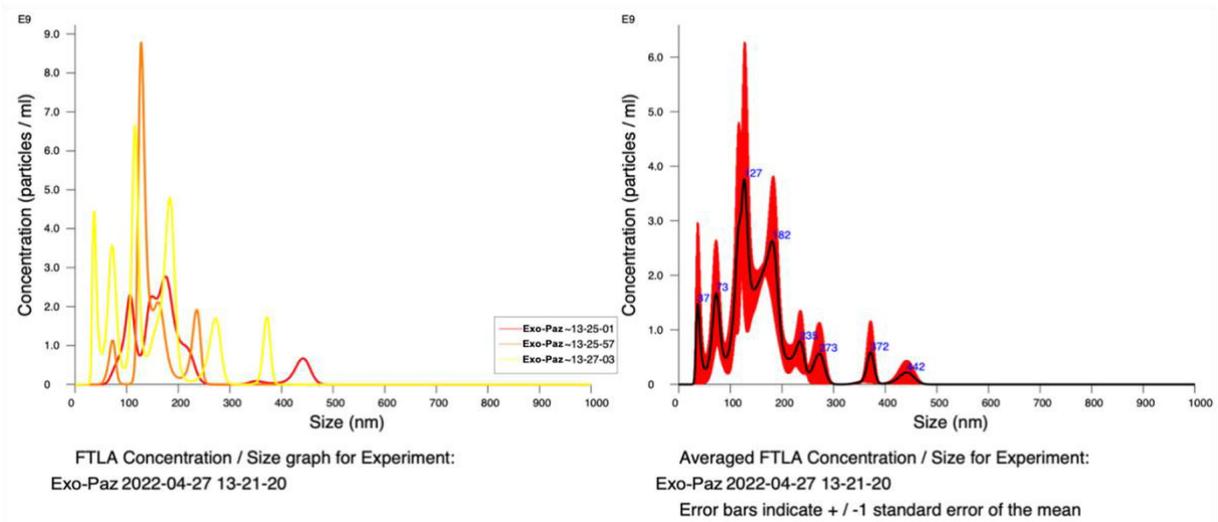


Abbildung 17 NTA-Assay der Exosomen von Caki-2 Paz (Verdünnung 1:500)
links: Einzelmessungen; rechts Mittelung der 3 Messungen

Bei einer Verdünnung von 1:1000 liegt der höchste Peak der Kurve der Exosomen der Caki-2 Paz bei 111 nm und der Modalwert bei $109,9 \pm 1,3$ nm (siehe Abbildung 16 und Tabelle 19). Deutlich mehr Peaks sind bei einer Verdünnung von 1:500 zu erkennen, wobei der höchste bei 127 nm und der Modalwert bei $139,9 \pm 18,1$ nm liegt (siehe Abbildung 17 und Tabelle 19). Die Konzentration der Exosomen der Caki-2 Paz belief sich bei einer Verdünnung von 1:1000 auf $2,38 \cdot 10^{11} \pm 2,21 \cdot 10^{10}$ Partikel/ml und bei einer Verdünnung von 1:500 auf $3,41 \cdot 10^{11} \pm 6,55 \cdot 10^{10}$ Partikel/ml (siehe Tabelle 19). Berechnet man die Mittelwerte und Standardfehler der Konzentrationen der beiden Verdünnungen, so liegt die Konzentration für die Exosomen von Caki-2 WT bei $2,80 \cdot 10^{11} \pm 5,15 \cdot 10^{10}$ und für Caki-2 Paz bei $2,89 \cdot 10^{11} \pm 5,95 \cdot 10^{10}$ Partikel/ml. Im Mittelwert besteht kein signifikanter Unterschied in der Konzentration der Exosomen der beiden Zelllinien ($p = 0,92$).

Zelllinie/ Verdünnung	Modalwert der Partikelgröße +/- Standardfehler [nm]	Konzentration +/- Standardfehler [Partikel/ml]
Caki-2 Paz/ 1:1000	109,9 +/- 1,3 nm	$2,38 \cdot 10^{11}$ +/- $2,21 \cdot 10^{10}$ Partikel/ml
Caki-2 Paz/ 1:500	139,9 +/- 18,1 nm	$3,41 \cdot 10^{11}$ +/- $6,55 \cdot 10^{10}$ Partikel/ml

Tabelle 19 NTA-Messergebnisse der Exosomen der Caki-2 Paz

6.4. Uptake Assay

6.4.1. Aufnahme der fluoreszenzmarkierten Exosomen

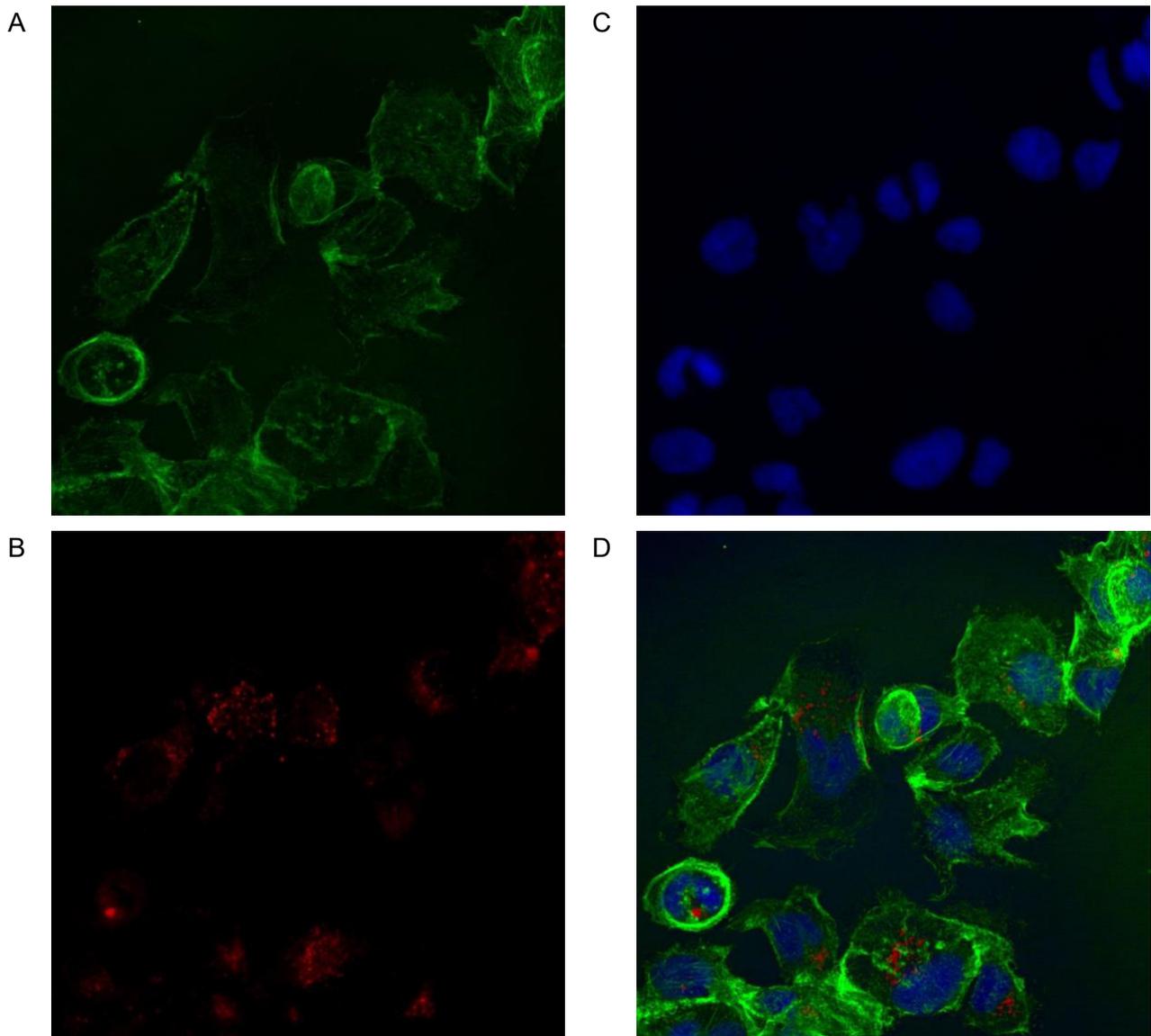


Abbildung 18 Fluoreszenzmikroskopie der Caki-2 WT (Versuch Feld 1) in 60x Vergrößerung (Inkubation mit 40 μ l WT-Exosomen); A) Grün: F-Actin (Alexa Fluor™ 488 Phalloidin); B) Rot: Exosomen (PKH26); C) Blau: Zellkerne (DAPI); D) Zusammenführung aller 3 Kanäle

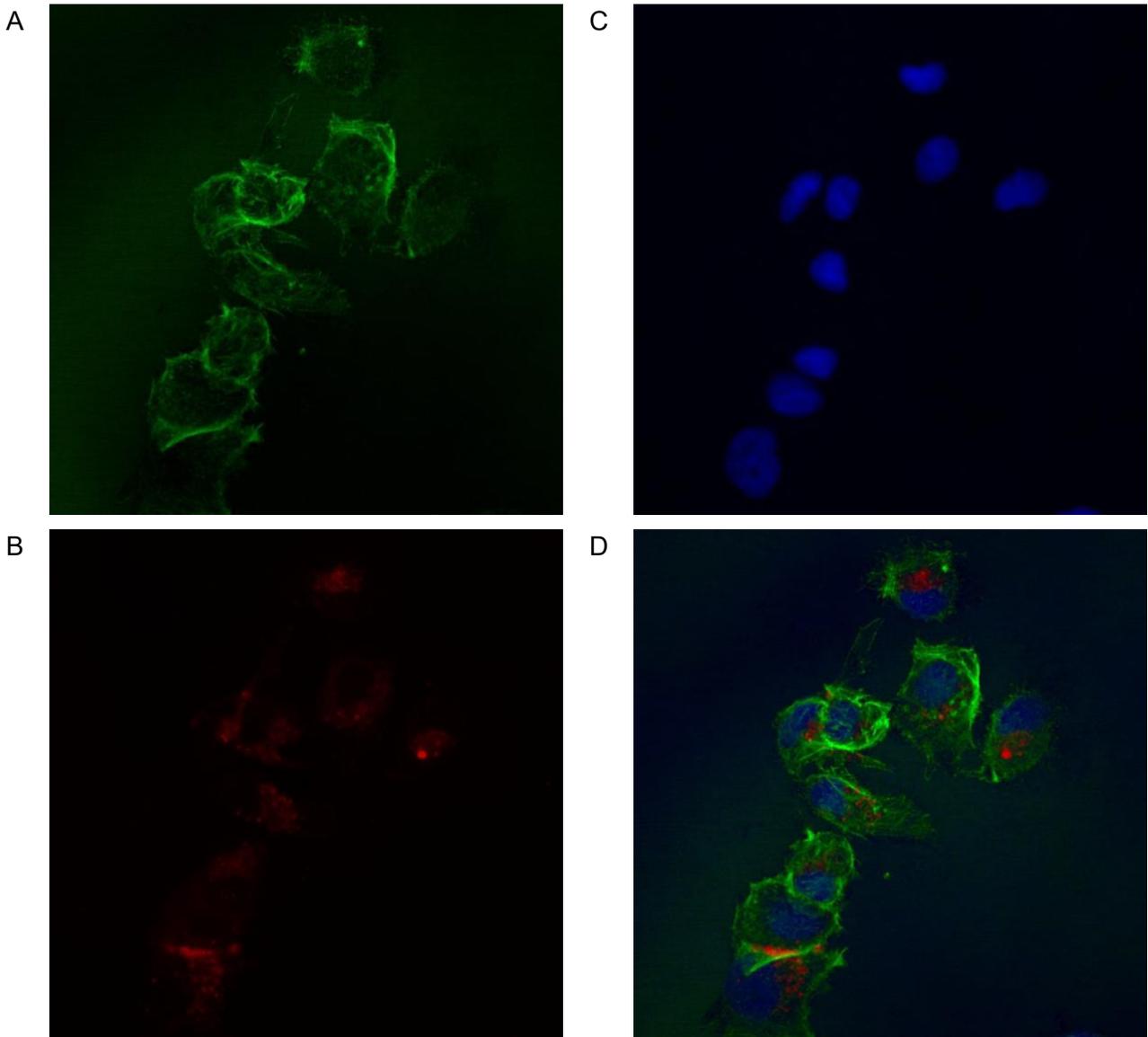


Abbildung 19 Fluoreszenzmikroskopie der Caki-2 WT (Versuch Feld 2) in 60x Vergrößerung (Inkubation mit 40 μ l WT-Exosomen); A) Grün: F-Actin (Alexa Fluor™ 488 Phalloidin); B) Rot: Exosomen (PKH26); C) Blau: Zellkerne (DAPI); D) Zusammenführung aller 3 Kanäle

Die Aufnahme der Exosomen durch die Caki-2 WT wurde im Uptake-Assay nachgewiesen (siehe Abbildung 18 und Abbildung 19). Die Aufnahmen zeigen Caki-2 WT, die mit 40 μ l Exosomen behandelt wurden. Die Exosomen (in rot) befinden sich intrazellulär (siehe Abbildung 18 und Abbildung 19). Um nachzuweisen, dass es sich bei den durch PKH26 angefärbten Strukturen tatsächlich um Exosomen handelt, wurde als Negativkontrolle PBS, das ebenfalls mit PKH26 versetzt wurde zu den Caki-2 WT gegeben, wobei keine rote Fluoreszenz detektiert werden konnte (siehe Abbildung 20 und Abbildung 21).

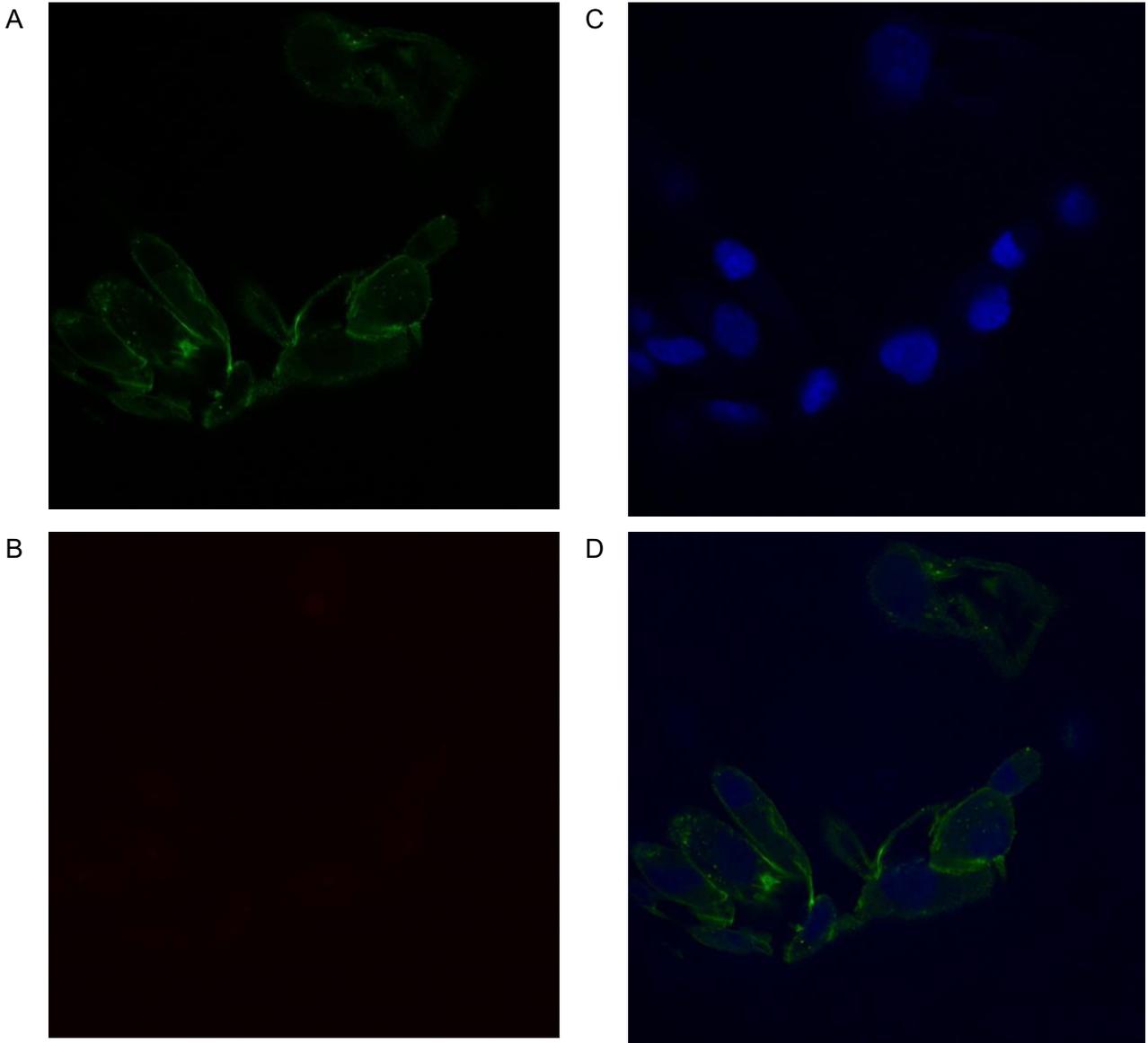
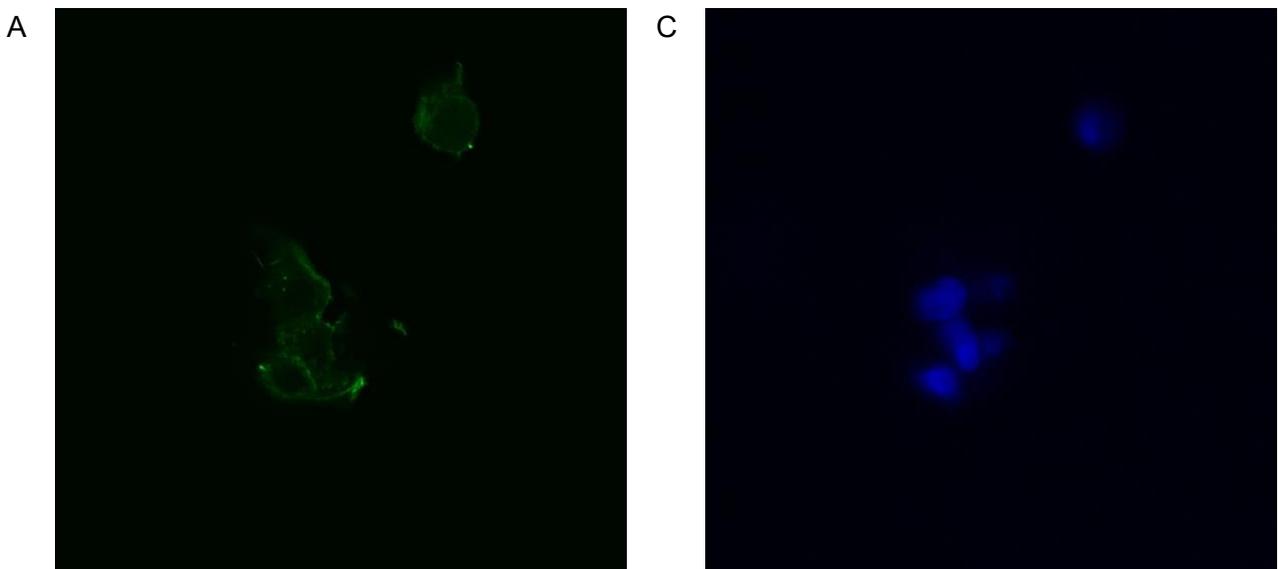


Abbildung 20 Fluoreszenzmikroskopie der Caki-2 WT (Negativkontrolle Feld 1) in 60x Vergrößerung (Negativkontrolle mit PBS); A) Grün: F-Actin (Alexa Fluor™ 488 Phalloidin); B) Rot: PKH26; C) Blau: Zellkerne (DAPI); D) Zusammenführung aller 3 Kanäle



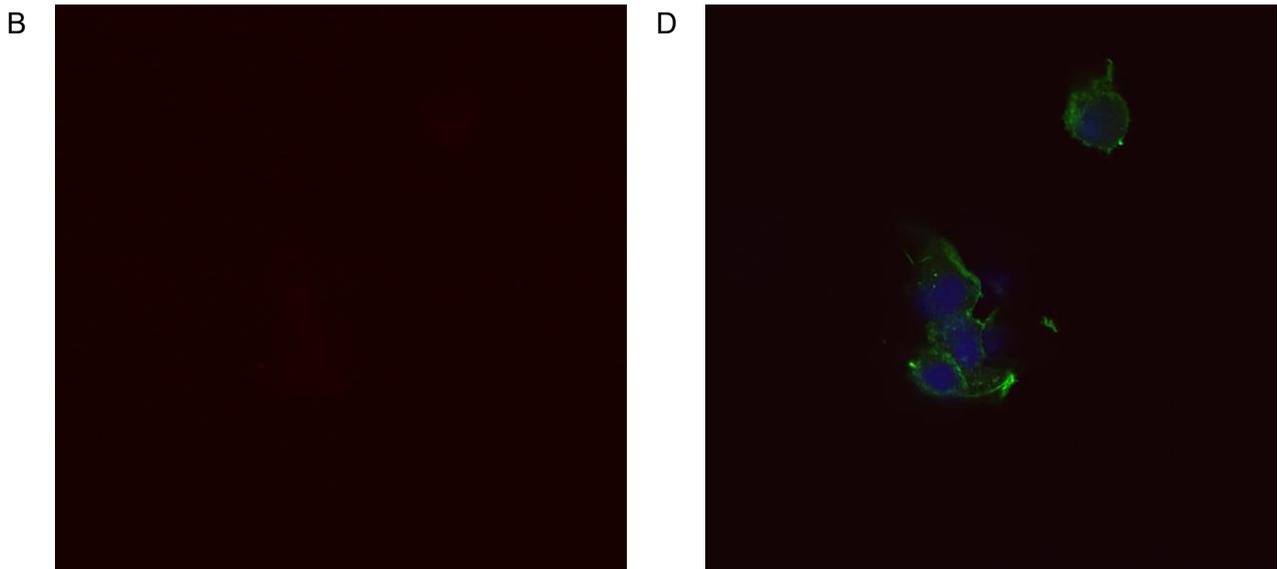


Abbildung 21 Fluoreszenzmikroskopie der Caki-2 WT (Negativkontrolle Feld 2) in 60x Vergrößerung (Negativkontrolle mit PBS); A) Grün: F-Actin (Alexa Fluor™ 488 Phalloidin); B) Rot: PKH26; C) Blau: Zellkerne (DAPI); D) Zusammenführung aller 3 Kanäle

6.5. Überprüfung der Resistenzübertragung im Functional Assay

In den Functional Assays wurde überprüft, ob die Pazopanibresistenz von der resistenten Zelllinie auf die sensitive Zelllinie übertragbar ist. Die verschiedenen Konzentrationen (8 µg/ml und 20 µg/ml) wurden appliziert, um etwaige konzentrationsabhängige Effekte zu untersuchen. Dadurch, dass als Kontrollgruppen zum einen Zellen vorlagen, die keine Exosomenstimulation, sondern nur PBS erhielten und zum anderen Caki-2 WT-Zellen, die mit den Exosomen der Caki-2 WT behandelt worden waren, konnte neben der Wirkung der Exosomen im Allgemeinen auch die Wirkung der Exosomen der resistenten mit denen der WT-Zellen verglichen werden. Insgesamt wurden drei Functional Assays durchgeführt. Da die Versuche getrennt dargestellt sind und nicht zusammengefasst wurden, konnte für die Einzelwerte kein statistischer Test erfolgen.

6.5.1. Functional Assay 1 (FA 1)

Betrachtet man die Zellviabilitäten der unterschiedlich vorbehandelten Zellen normalisiert zu den jeweiligen DMSO-Kontrollen unter 11 µM Pazopanib, so unterscheiden sich diese unabhängig von der Vorbehandlung im 1. Functional Assay (FA1) kaum und liegen alle etwa bei 70% (69% unter 20 µg/ml Paz-Exo, 71% unter 8 µg/ml Exo-WT, 8 µg/ml Exo-Paz und 20 µg/ml Exo-WT und 72% unter PBS ohne Exosomen, siehe Abbildung 22). Mit einer Viabilität von 83% überleben die resistenten Zellen geringfügig besser als die WT-Zellen mit 69 bis 72 % Viabilität (siehe Abbildung 22). Die Caki-2 WT waren beim ersten Functional Assay in Passage 60 und die verwendeten Exosomen stammten von Zellen der Passage 63.

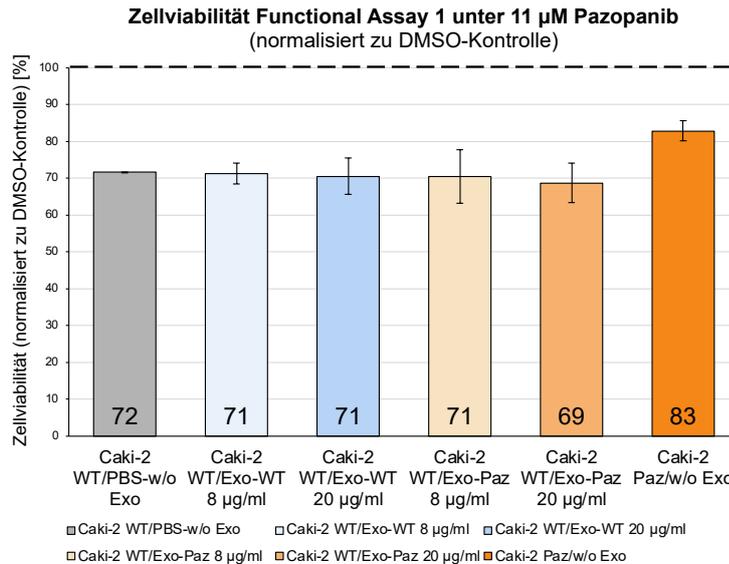


Abbildung 22 Zellviabilität für FA 1 unter 11 μ M Paz normalisiert zur DMSO-Kontrolle mit Standardabweichungen; die gestrichelte Linie bei 100% entspricht der DMSO-Kontrolle; Caki-2 WT/PBS-w/o Exo= Caki-2 WT, die nur mit PBS vorbehandelt wurden; Caki-2 WT/Exo-WT 8 μ g/ml bzw. 20 μ g/ml= Caki-2 WT, die mit Exosomen der Caki-2 WT vorbehandelt wurden; Caki-2 WT/Exo-Paz 8 μ g/ml bzw. 20 μ g/ml= Caki-2 WT, die mit Exosomen der Caki-2 Paz vorbehandelt wurden; Caki-2 Paz/w/o Exo= Caki-2 Paz, die weder mit PBS noch mit Exosomen vorbehandelt wurden

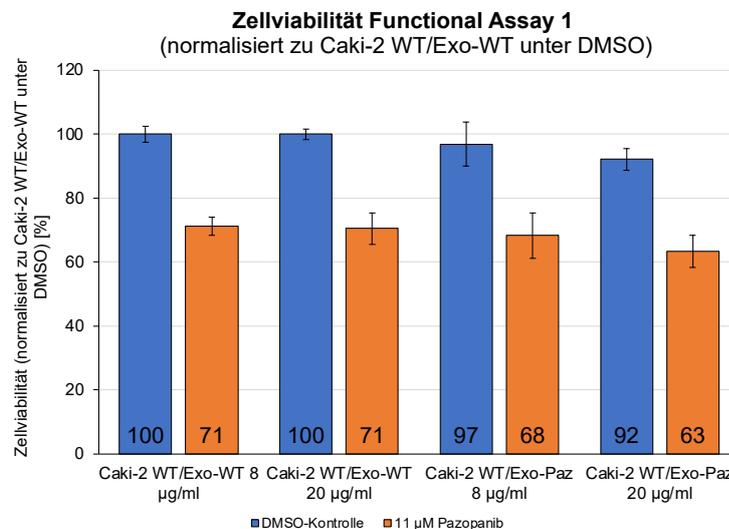


Abbildung 23 Zellviabilität für FA 1 normalisiert zu Caki-2 WT/Exo WT unter DMSO mit Standardabweichungen; Caki-2 WT/Exo-WT 8 μ g/ml bzw. 20 μ g/ml= Caki-2 WT, die mit Exosomen der Caki-2 WT vorbehandelt wurden; Caki-2 WT/Exo-Paz 8 μ g/ml bzw. 20 μ g/ml= Caki-2 WT, die mit Exosomen der Caki-2 Paz vorbehandelt wurden

Normalisiert man die gemessene Absorption zu den Caki-2 WT unter DMSO, die mit 8 μ g/ml oder 20 μ g/ml WT-Exosomen vorbehandelt wurden, so verändert sich auch hier die Viabilität durch die verschiedenen Vorbehandlungen unter 11 μ M Pazopanib kaum. Auch hier liegt die Viabilität bei allen Zelltypen bei etwa 70% (63% unter 20 μ g/ml Exo-Paz, 68% unter 8 μ g/ml Exo-Paz, 71% unter 20 μ g/ml Exo-WT und 71% unter 8 μ g/ml Exo-WT, vgl. Abbildung 23). Vergleicht man die Viabilität unter 11 μ M Pazopanib getrennt nach den verschiedenen Exosomenkonzentrationen (8 μ g/ml Exo-WT zu 8 μ g/ml Exo-Paz sowie 20 μ g/ml Exo-WT zu

20 µg/ml Exo-Paz) so nimmt die Viabilität geringfügig ab (bei 8 µg/ml unter den Paz-Exosomen um 3% (71% zu 68%) und unter 20 µg/ml um 8% (71% zu 63%; siehe Abbildung 23)).

6.5.2. Functional Assay 3 (FA 3)

Auch im 3. Functional Assay zeigt sich kaum eine Veränderung der Viabilität unter Behandlung mit 11 µM Pazopanib normalisiert zu der jeweiligen DMSO-Kontrolle. Alle Viabilitäten bewegen sich im Bereich von 72% bis 81% (72% unter 20 µg/ml Exo-WT, 74% unter 20 µg/ml Exo-Paz und Caki-2 Paz, 75% unter 8 µg/ml Exo-WT, 77% unter 8 µg/ml Exo-Paz sowie 81% unter PBS ohne Exosomen), wobei keine der Vorbehandlungen die Viabilität, der mit PBS vorbehandelten Zellen überschreitet (siehe Abbildung 24). Auch die Viabilität der Caki-2 Paz ist hier nicht höher als die der Caki-2 WT. In der Mikroskopie fiel während der Aufzucht der Caki-2 Paz auf, dass diese im Vergleich zu den Caki-2 WT deutlich langsamer wuchsen. Für diesen Versuch wurden Caki-2 WT der Passage 60 eingesetzt, die mit Exosomen der Passage 57 behandelt wurden.

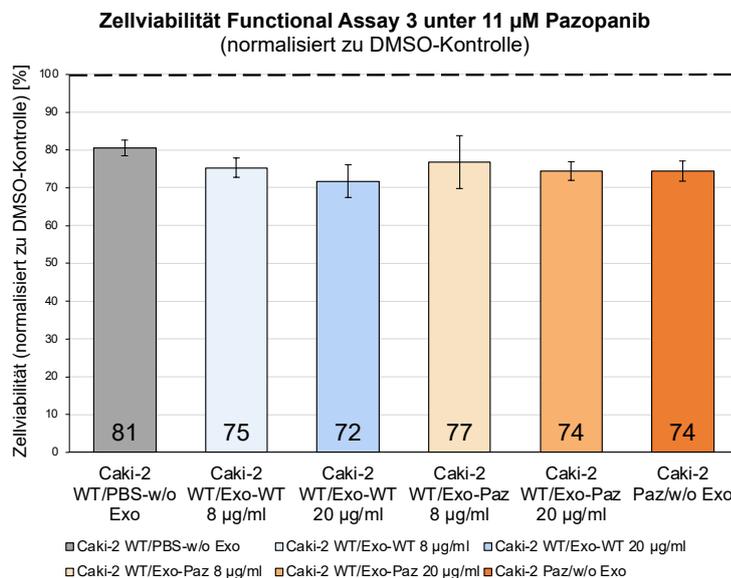


Abbildung 24 Zellviabilität für FA 3 unter 11 µM Paz normalisiert zur DMSO-Kontrolle mit Standardabweichungen; die gestrichelte Linie bei 100% entspricht der DMSO-Kontrolle; Caki-2 WT/PBS-w/o Exo= Caki-2 WT, die nur mit PBS vorbehandelt wurden; Caki-2 WT/Exo-WT 8 µg/ml bzw. 20 µg/ml= Caki-2 WT, die mit Exosomen der Caki-2 WT vorbehandelt wurden; Caki-2 WT/Exo-Paz 8 µg/ml bzw. 20 µg/ml= Caki-2 WT, die mit Exosomen der Caki-2 Paz vorbehandelt wurden; Caki-2 Paz/w/o Exo= Caki-2 Paz, die weder mit PBS noch mit Exosomen vorbehandelt wurden

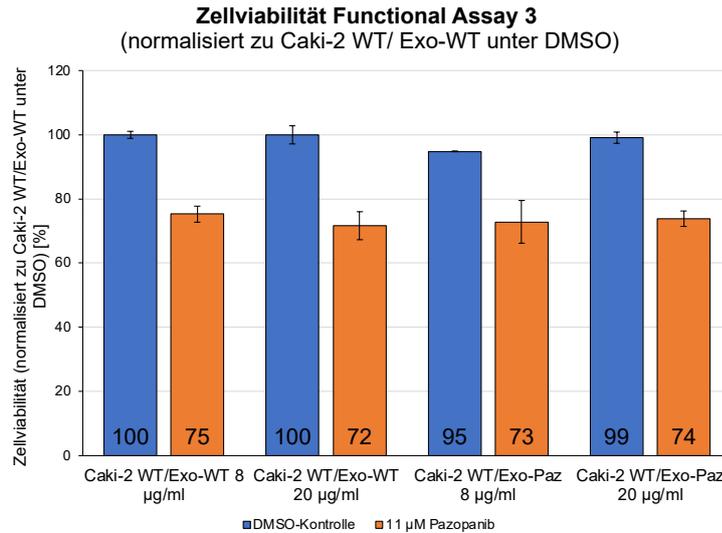


Abbildung 25 Zellviabilität für FA 3 normalisiert zu Caki-2 WT/Exo WT unter DMSO mit Standardabweichungen; Caki-2 WT/Exo-WT 8 µg/ml bzw. 20 µg/ml= Caki-2 WT, die mit Exosomen der Caki-2 WT vorbehandelt wurden; Caki-2 WT/Exo-Paz 8 µg/ml bzw. 20 µg/ml= Caki-2 WT, die mit Exosomen der Caki-2 Paz vorbehandelt wurden

Ebenso wie bei der Normalisierung zu DMSO zeigt sich unabhängig von der jeweiligen Vorbehandlung bei der Normalisierung zu Caki-2 WT, die mit WT-Exosomen vorbehandelt waren unter DMSO, kein Unterschied der Viabilität. Alle Viabilitäten befinden sich im Bereich zwischen 72% und 75% unter Pazopanib (72% unter 20 µg/ml Exo-WT, 73% unter 8 µg/ml Exo-Paz, 74% unter 20 µg/ml Exo-Paz, sowie 75% unter 8 µg/ml Exo-WT, siehe Abbildung 25).

6.5.3. Functional Assay 2 (FA 2)

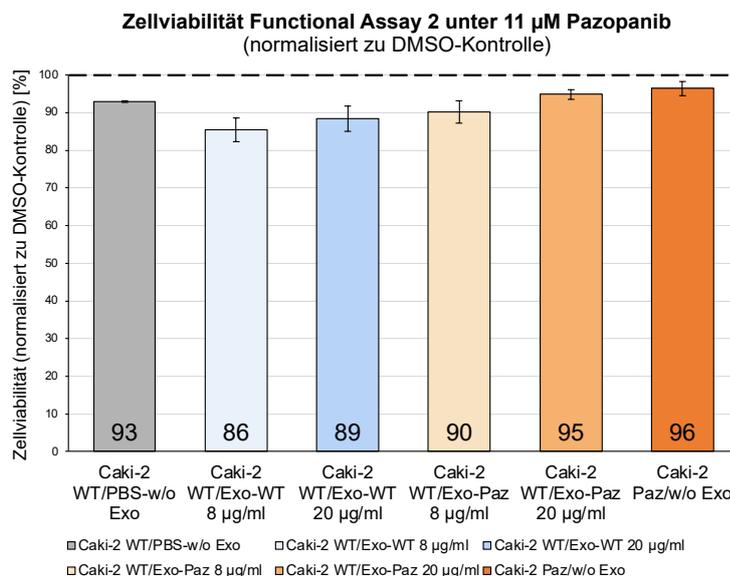


Abbildung 26 Zellviabilität für FA 2 unter 11 µM Paz normalisiert zur DMSO-Kontrolle mit Standardabweichungen; die gestrichelte Linie bei 100% entspricht der DMSO-Kontrolle; Caki-2 WT/PBS-w/o Exo= Caki-2 WT, die nur mit PBS vorbehandelt wurden; Caki-2 WT/Exo-WT 8 µg/ml bzw. 20 µg/ml= Caki-2 WT, die mit Exosomen der Caki-2 WT vorbehandelt wurden; Caki-2 WT/Exo-Paz 8 µg/ml bzw. 20 µg/ml= Caki-2 WT, die mit Exosomen der Caki-2 Paz vorbehandelt wurden; Caki-2 Paz/w/o Exo= Caki-2 Paz, die weder mit PBS noch mit Exosomen vorbehandelt wurden

Beim 2. Functional Assay fallen die hohen Viabilitätswerte unter 11 μ M Pazopanib normalisiert zu DMSO auf. Statt Werten um die 50% lagen alle Zellen unabhängig von der Vorbehandlung jenseits der 80% (86% unter 8 μ g/ml Exo-WT, 89% unter 20 μ g/ml Exo-WT, 90% unter 8 μ g/ml Exo-Paz, 95% unter 20 μ g/ml Exo-Paz, 96% bei Caki-2 Paz, siehe Abbildung 26). Im direkten Vergleich der einzelnen Konzentrationen der Exosomen untereinander (8 μ g/ml Exo-WT zu 8 μ g/ml Exo-Paz sowie 20 μ g/ml Exo-WT zu 20 μ g/ml Exo-Paz) ist hier unter den Exo-Paz ein leichter Anstieg der Viabilität von 4% bei 8 μ g/ml (86% zu 90%) und 6% bei 20 μ g/ml (89% zu 95%) zu sehen. Die Zellen, die nur mit PBS vorbehandelt wurden, zeigten eine Viabilität von 93% unter Pazopanib. Unter der Vorbehandlung mit WT-Exosomen sank die Viabilität im Vergleich zur PBS-Vorbehandlung leicht ab (um 7% bei 8 μ g/ml und 4% bei 20 μ g/ml Exosomen). Lediglich die mit 20 μ g/ml Exo-Paz vorbehandelten Zellen und die resistenten Caki-2 Paz überschritten die Viabilität der mit PBS behandelten Zellen geringfügig. Insgesamt war die Wirkung des Pazopanibs auf die Viabilität nur marginal. Für das 2. FA wurden Zellen der Passage 60 verwendet, die mit Exosomen der Passage 60 behandelt wurden.

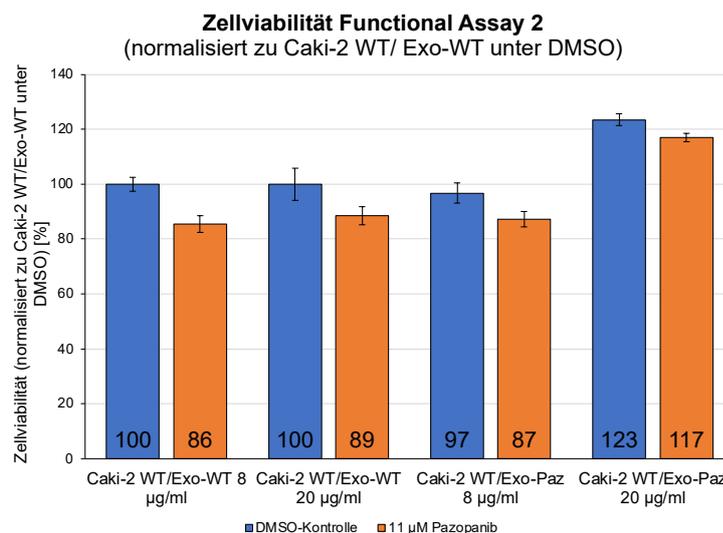


Abbildung 27 Zellviabilität für FA 2 normalisiert zu Caki-2 WT/Exo WT unter DMSO mit Standardabweichungen; Caki-2 WT/Exo-WT 8 μ g/ml bzw. 20 μ g/ml= Caki-2 WT, die mit Exosomen der Caki-2 WT vorbehandelt wurden; Caki-2 WT/Exo-Paz 8 μ g/ml bzw. 20 μ g/ml= Caki-2 WT, die mit Exosomen der Caki-2 Paz vorbehandelt wurden

Im Gegensatz zu Functional Assay 1 und 3 zeigte sich beim 2. FA bei der Normalisierung zu Caki-2 WT/Exo-WT unter DMSO ein Anstieg der Viabilität sowohl unter DMSO als auch unter 11 μ M Pazopanib bei den mit 20 μ g/ml Paz-Exosomen vorbehandelten Caki-2 WT-Zellen auf 123% unter DMSO und 117% unter Pazopanib (siehe Abbildung 27). Dies entspricht einem Anstieg um 28% unter Pazopanib und 23% unter DMSO gegenüber den Caki-2 WT, die mit 20 μ g/ml WT-Exosomen behandelt worden waren. Alle anderen Vorbehandlungen zeigten keine Unterschiede in der Viabilität und bewegten sich zwischen 86% und 89 % unter 11 μ M Pazopanib (86% unter 8 μ g/ml Exo-WT, 87% unter 8 μ g/ml Exo-Paz und 89% unter 20 μ g/ml Exo-WT). Auch bei dieser Normalisierung lagen die Viabilitätswerte weit über den erwartungsgemäßen 50%.

Aufgrund des geringen Ansprechens der WT-Zellen im FA 2 auf die Behandlung mit 11 μM Pazopanib, was der IC50 dieser Zellen entspricht, stellte sich die Frage, ob das Medikament wirkt. Hierzu wurden zwei Medikamententests durchgeführt, bei denen die Zellen mit 11 μM und 22 μM Pazopanib sowie 0,22% DMSO behandelt wurden und anschließend mittels WST-1 die Viabilität bestimmt wurde. Aus den Viabilitäten der beiden Versuche unter 11 μM Pazopanib wurde zusammen mit den Viabilitäten aus den ersten beiden Functional Assays unter 11 μM ein Mittelwert berechnet, der bei 82,3% lag (siehe Abbildung 28). Um zu verhindern, dass die Experimente durch Unterschiede zwischen einzelnen Medikamentenchargen beeinflusst werden, wurde bei allen Versuchen darauf geachtet, dass jeweils die gleiche Charge eingesetzt wurde. Das führte dazu, dass sowohl die Versuche zur Resistenztestung zu Beginn der Experimente als auch die Functional Assays 1 und 2 mit der gleichen Charge Pazopanib HCl durchgeführt wurden. Da zwischen diesen Versuchen jedoch ca. 4 Monate lagen, stellte sich die Frage, ob es zu einem Wirkverlust über diese Zeit gekommen war. Um dies zu überprüfen, wurde der Mittelwert der Viabilitäten aus den Functional Assays sowie den Medikamententests in den direkten Vergleich zu den Mittelwerten der Viabilitäten der Caki-2 WT unter 11 μM aus allen 6 Resistenztests inklusive des ersten Vorversuchs gesetzt (siehe Abbildung 28). Mit einer Viabilität von 48,4% zeigten die Wildtypzellen in den Resistenztests ein signifikant stärkeres Ansprechen ($p = 8,98 \cdot 10^{-6}$) auf die Behandlung mit 11 μM Pazopanib als 4 Monate später mit 82,3%. Aufgrund dieses Erkenntnis wurde für das 3. Functional Assay eine andere Charge als für die ersten beiden FA verwendet. Auch dieses Medikament wurde im Vorfeld des 3. Functional Assays an den Caki-2 WT getestet, wobei die Caki-2 WT eine Viabilität von 64,7% unter 11 μM (Mittelwert aus 2 biologischen und je 3 technischen Replikaten, normalisiert zu Caki-2 WT unter 0,3% DMSO) aufwies, sodass das 3. Functional Assay gestartet werden konnte. Im Rahmen der Überprüfung der Wirksamkeit der verschiedenen Chargen des Pazopanibs wurde auch das Pazopanib HCl eines anderen Herstellers getestet, wobei dieses Medikament bereits bei 18 μM mikroskopisch Kristalle aufwies und dementsprechend Artefakte bei der WST-1-Untersuchung auftraten, weshalb das Medikament dieses anderen Herstellers in den Versuchen nicht zur Anwendung kam.

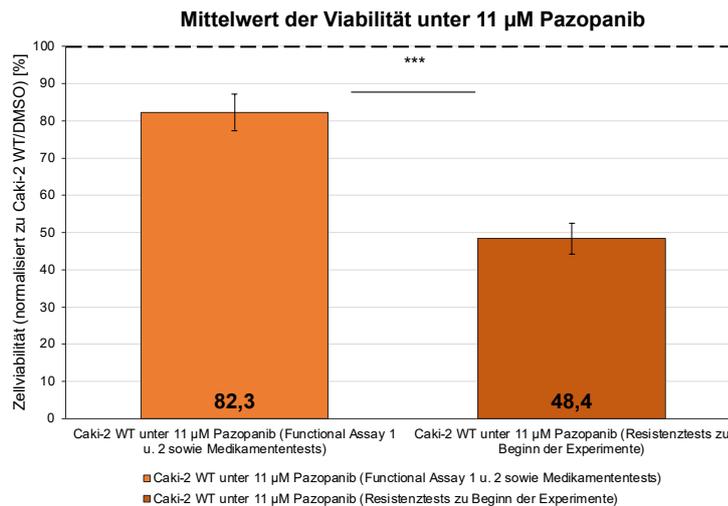


Abbildung 28 Vergleich der Mittelwerte der Viabilität unter 11 µM Paz der gleichen Charge zu verschiedenen Zeitpunkten (normalisiert zu Caki-2 WT unter DMSO); mit Standardfehlern; die gestrichelte Linie bei 100% entspricht der DMSO-Kontrolle; $p = 8,98 \cdot 10^{-6}$ (die Functional Assays 1 und 2, sowie der Medikamententest (linke Säule) erfolgten etwa 4 Monate nach den Resistenztests (rechte Säule))

6.5.4. Zusammenfassung der Ergebnisse der Functional Assays

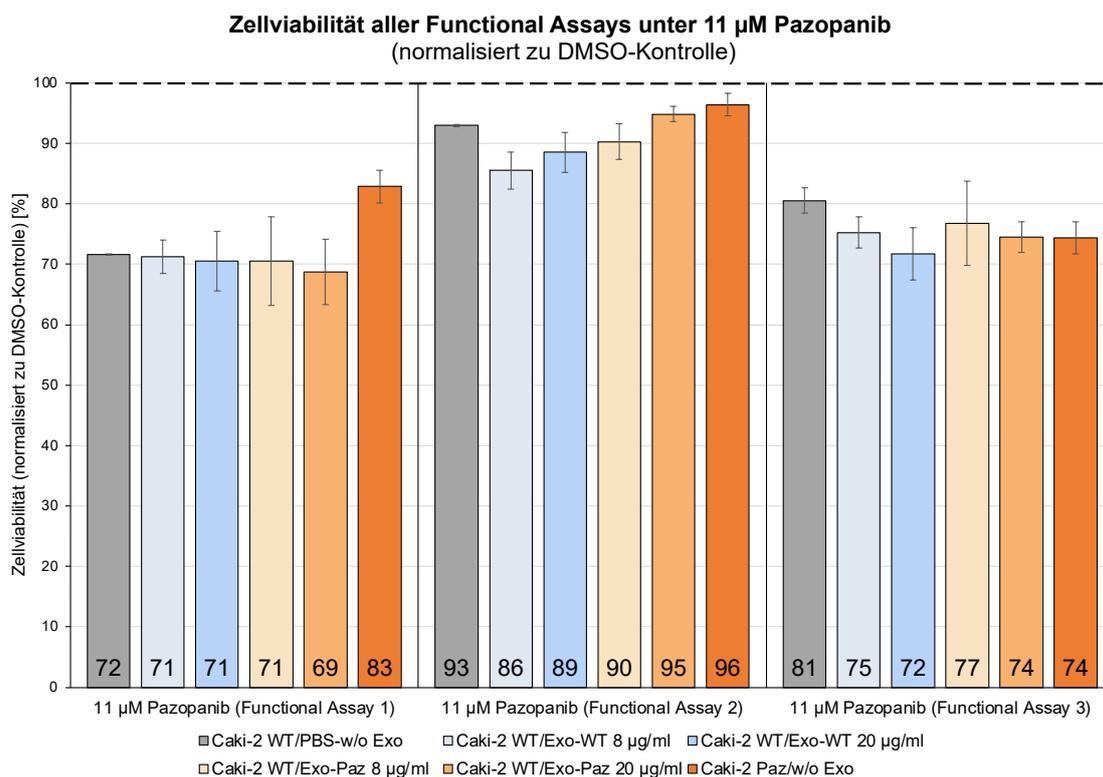


Abbildung 29 Zellviabilität FA 1-3 unter 11 µM Paz normalisiert zur DMSO-Kontrolle mit Standardabweichungen; die gestrichelte Linie bei 100% entspricht der DMSO-Kontrolle; Caki-2 WT/PBS-w/o Exo= Caki-2 WT, die nur mit PBS vorbehandelt wurden; Caki-2 WT/Exo-WT 8 µg/ml bzw. 20 µg/ml= Caki-2 WT, die mit Exosomen der Caki-2 WT vorbehandelt wurden; Caki-2 WT/Exo-Paz 8 µg/ml bzw. 20 µg/ml= Caki-2 WT, die mit Exosomen der Caki-2 Paz vorbehandelt wurden; Caki-2 Paz/w/o Exo= Caki-2 Paz, die weder mit PBS noch mit Exosomen vorbehandelt wurden

In der Zusammenschau aller drei FA zeigen FA1 und FA3 eine ähnliche Grundtendenz (siehe Abbildung 29). Bei beiden FA konnte keine der Vorbehandlungen mit Exosomen einen Überlebensvorteil gegenüber den mit PBS behandelten Zellen erreichen. Auch die Viabilitäten

bewegen sich mit ca. 70 bis 75% in sehr ähnlichen Bereichen. Während die resistenten Caki-2 Paz im FA1 mit 83% und somit 11% höherer Viabilität als die unbehandelten Caki-2 WT (PBS w/o Exo) überlebten, war ihre Viabilität im 3.FA 7% niedriger als jene der unbehandelten Zellen. Functional Assay 2 fällt gegenüber den anderen beiden FA aus dem Rahmen, da nur in diesem Versuch ein leichter Anstieg der Viabilität unter der steigenden Konzentration der Paz-Exosomen gezeigt werden konnte. Ein weiterer Unterschied sind die bereits beschriebenen deutlich höher liegenden Viabilitäten (zwischen 86% und 96%; vergleiche hierzu Abbildung 29).

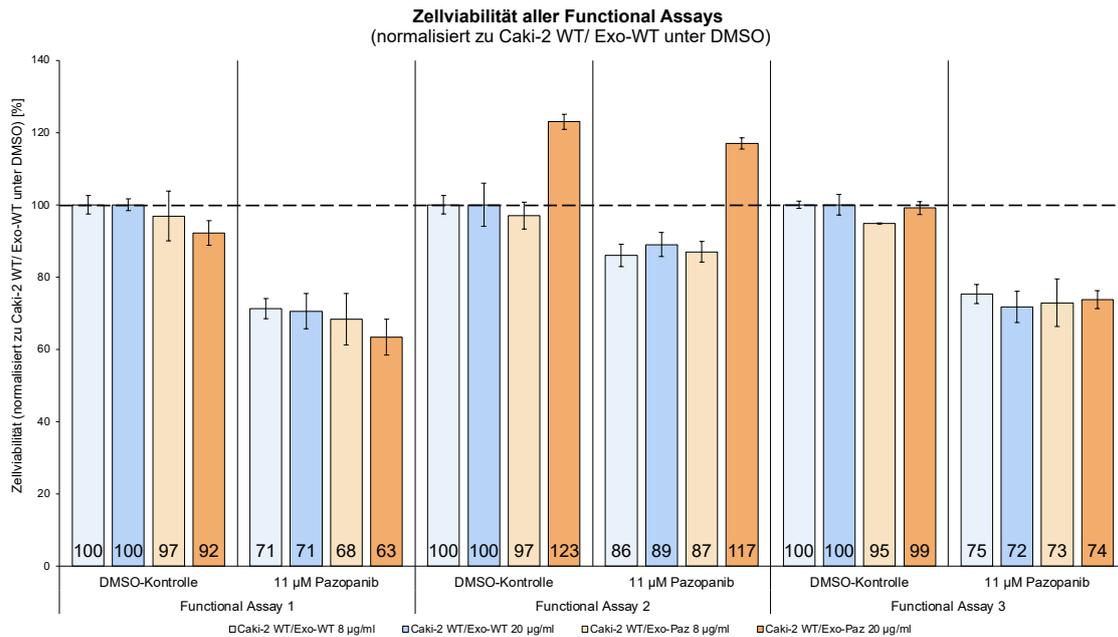


Abbildung 30 Zellviabilität FA 1-3 normalisiert zu Caki-2 WT/Exo WT unter DMSO mit Standardabweichungen; Caki-2 WT/Exo-WT 8 µg/ml bzw. 20 µg/ml= Caki-2 WT, die mit Exosomen der Caki-2 WT vorbehandelt wurden; Caki-2 WT/Exo-Paz 8 µg/ml bzw. 20 µg/ml= Caki-2 WT, die mit Exosomen der Caki-2 Paz vorbehandelt wurden

Auch die Normalisierung zu den Caki-2 WT unter DMSO, die mit WT-Exosomen vorbehandelt wurden, veranschaulicht die Ähnlichkeit von FA1 und FA3 (siehe Abbildung 30). Gegenüber den Zellen, die mit Wildtypexosomen behandelt wurden, weisen jene mit Paz-Exosomen behandelten keine höhere Viabilität auf. Der in FA2 hier sichtbare Anstieg der Viabilität unter DMSO (auf 123%) und Pazopanib (auf 117%) für die mit 20 µg/ml Paz-Exosomen vorbehandelten Caki-2 WT konnte in den anderen beiden FA so nicht beobachtet werden, sodass FA2 eher als Ausreißer zu werten ist.

7. Diskussion

Das Nierenzellkarzinom stellt als häufigste uroonkologische Entität der Frau und als dritthäufigste des Mannes eine wichtige Erkrankung dar [229]. Während die relative 5-Jahres-Überlebensrate nach Daten des Tumorregisters München für lokal begrenzte Tumore der TNM-Kategorie T1M0 mit 98,9% sehr gut ist, nimmt diese drastisch durch das Auftreten von Fernmetastasen auf nur noch 18% ab [280]. In diesem Stadium ist neben der zytoreduktiven Nephrektomie die Systemtherapie im Sinne einer Checkpointinhibitorkombinationstherapie von zentraler Bedeutung für die Behandlung (vergleiche hierzu die Empfehlungen der S3-Leitlinie [153]). Ist eine Checkpointinhibitorkombinationstherapie nicht möglich, so treten die Tyrosinkinaseinhibitoren an die erste Stelle der Therapie [153]. Unter den dabei möglichen Optionen ist unter anderem der Tyrosinkinaseinhibitor Pazopanib zu finden [153]. Pazopanib stellt dabei gegenüber Sunitinib eine nicht unterlegene [197] Alternative dar, die in der PISCES-Studie von 70% der Patient*innen aufgrund einer besseren Lebensqualität und geringerer Fatiguesymptomatik Sunitinib vorgezogen wurde [67]. Die mediane Dauer des Therapieansprechens auf Pazopanib lag den Daten der Phase III Studie zufolge bei etwa 15 Monaten, nach denen sich schließlich eine sekundäre Resistenz entwickelte [260]. Die Resistenzentwicklung stellt hierbei ein großes therapeutisches Problem dar, weshalb sie ins Interesse der Forschung gerückt ist [294]. In diesem Zusammenhang erschienen in den letzten Jahren viele Publikationen, die die Rolle der Exosomen in der Resistenzinduktion gegen verschiedene Therapeutika unter anderem in Modellen des Mamma-Karzinoms [326,331], des Magenkarzinoms [264], des Ovarialkarzinoms [336], des kolorektalen Karzinoms [193,312], aber auch des Lungenkarzinoms [11,167] untersucht und nachgewiesen haben.

Die Grundlage zur Hypothese, dass die Pazopanibresistenz im Nierenzellkarzinom exosomal vermittelt sein könnte, lieferte unter anderem eine Publikation von Qu et al. [215]. Die Gruppe etablierte sunitinibresistente Zellen im Xenograftmodell und wies nach, dass diese erworbene Resistenz über Exosomen auf sensitive Zellen übertragbar war [215]. Hierbei stellten sie einen Zusammenhang der Resistenz mit einer lncRNA fest, die sogenannte lncARSR („lncRNA Activated in RCC with Sunitinib Resistance“), ebenso wie deren enge Verbindung zum AXL/c-MET-Signalweg [215]. Durch die Blockade der lncARSR oder auch AXL/c-MET konnte eine Resensitivierung erreicht werden, was die Bedeutung dieser lncRNA für die Resistenzentwicklung verdeutlicht [215]. Die Erkenntnis von Greenberg et al., dass durch die gleichzeitige Applikation von Sunitinib und Ketokonazol neben der reduzierten Tumorpheriferation und der verminderten klonogenen Fähigkeit durch Ketokonazol auch die Biogenese und Ausschüttung der Exosomen reduziert ist und gleichzeitig die Wirkung von Sunitinib bei resistenten Zellen gesteigert ist, unterstreicht u.a. den Einfluss der Exosomen auf die Resistenz [89].

He et al. entdeckten, dass die erworbene Sorafenibresistenz in Nierenzellkarzinomen ebenfalls über Exosomen auf sensitive Zellen übertragbar ist, wobei sie dies auf die miR-31-5p zurückführten [100]. Während die miR-31-5p in resistenten Zellen sowie in deren Exosomen hochreguliert war, war ihr Target MLH-1 herunterreguliert [100]. Auch in Blutproben von Patient*innen mit progressive disease unter Sorafenib war die miR-31-5p hochreguliert, sodass sowohl die miRNA als auch ihr Target einen potentiellen prädiktiven Biomarker in Bezug auf die Entwicklung einer Sorafenibresistenz darstellen [100].

Zum jetzigen Zeitpunkt wurde diese Form der Resistenzübertragung noch nicht für die Pazopanibresistenz des Nierenzellkarzinoms nachgewiesen. An diesem Punkt setzt die vorliegende Dissertation an.

7.1. Resistenznachweis

Das erste Ziel dieser Dissertation war es, die Resistenz der Caki-2 Paz Zellen zu bestätigen. Bei den hierzu durchgeführten WST-1 Zellviabilitätstests zeigte sich im Mittelwert der biologischen Replikate eine Resistenz der Caki-2 Paz gegenüber den Caki-2 WT insbesondere unter den niedrigeren Pazopanibkonzentrationen (3 μM , 6 μM , 11 μM) für Passage 60 und 61, da sich hier die Viabilitäten signifikant unterschieden. Die Viabilitätskurve der Caki-2 WT zeigte eine andere Kinetik als die der Caki-2 Paz und stabilisierte sich unter den hohen Pazopanibkonzentrationen (14 μM , 18 μM und 20 μM) bei Werten zwischen 43% und 34%.

Betrachtet man die Viabilität der Caki-2 WT und Caki-2 Paz unter 11 μM Pazopanib für die Passagen 59 bis 61, so liegt die Viabilität der Caki-2 Paz mit 96,5% signifikant höher als jene der Caki-2 WT mit 48,9%. Auch die IC50 der beiden Zelllinien unterscheidet sich signifikant, wobei die Caki-2 WT eine IC50 von 11,1 μM und die Caki-2 Paz von 16,1 μM aufweisen.

Die signifikanten Unterschiede der Viabilität unter 11 μM sowie der IC50 der beiden Zelllinien bestätigen somit die Resistenz der Caki-2 Paz aus den Voruntersuchungen. Außerdem wurde hiermit die im Vorfeld bestimmte IC50 der Caki-2 WT bestätigt, auf deren Grundlage die Dauerbehandlung der Caki-2 Paz mit 11 μM Pazopanib erfolgte [293].

Stamati et al. arbeiteten in ihrer Studie u.a. ebenfalls mit Caki-2-Zellen und Pazopanib [258]. Unter 40 μM Pazopanib zeigten die Caki-2 eine Viabilität von 54%, was sich mit der hier beobachteten Stabilisierung der Viabilität unter hohen Pazopanibkonzentrationen (z.B. 20 μM) deckt [258]. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass Stamati et al. neben einer anderen Methode zur Viabilitätstestung (CellTiter Glo 3D; Promega UK) auch eine kürzere Inkubationszeit mit dem Pazopanib gewählt hatten (48h), sodass die Werte nur bedingt vergleichbar sind [258]. Auch in einer Studie von Majo et al. wurden die Caki-2 mit Pazopanib in unterschiedlichen Konzentrationen (0,03 μM bis 30 μM) behandelt, wobei auch hier die Zellen unter 30 μM eine optische Dichte von etwa 0,4 gegenüber 0,7 ohne Pazopanib im MTS aufwiesen und somit nur zum Teil ansprachen [173]. Neben einer anderen Zellzahl (1000

Zellen/Well) wurde ein anderer Viabilitätstest (MTS; Promega) sowie eine deutlich kürzere Inkubationszeit gewählt (24h), was den direkten Vergleich erschwert [173].

Sowohl für Sunitinib als auch für Pazopanib wurde die lysosomale Sequestrierung als möglicher Resistenzmechanismus beschrieben [87,88]. Diese Resistenzform führt zu hohen intrazellulären Konzentrationen des Medikaments durch die Anhäufung innerhalb der Lysosomen, wobei die zytoplasmatische Verfügbarkeit sinkt [87]. Möglicherweise erklärt eine solche intrazelluläre Anhäufung auch, weshalb bei den Caki-2 Paz intrazellulär mikroskopisch kristallähnliche Strukturen sichtbar waren (siehe Abbildung 9).

Die Konzentration von Pazopanib im Plasma bei Patient*innen sollte mindestens 20,5 mg/l (\approx 43,2 μ M; durch die Verfasserin der Dissertation anhand Molekulargewicht von 473,99 g/mol (aus [282]) berechnet) betragen, da sich dies positiv auf das PFS sowie die Tumorreduktion auswirkt [265]. Auch im Mausmodell war für die optimale Wirkung in-vivo eine Pazopanibkonzentration von mindestens 40 μ M (\approx 17,5 mg/l) nötig [147]. Für VEGF-stimulierte HUVEC lag die IC50 bei etwa 0,02 μ M [147], für 786-O bei 6,5 μ M und für HT-29 bei 0,8 μ M [88] und somit ebenso wie die hier bestimmte IC50 von 11,1 μ M (Caki-2 WT) bzw. 16,1 μ M (Caki-2 Paz) deutlich unterhalb der 40 μ M. Die Unterschiede der in-vivo und in-vitro-Konzentrationen können laut Kumar et al. auf die starke Plasmaproteinbindung von über 99,9% des Pazopanibs zurückgeführt werden [118,147].

Im Xenograftmodell wurden unter anderem Caki-2 Zellen in Mäuse implantiert und die daraus resultierenden Tumore mit Pazopanib in verschiedenen Konzentrationen behandelt [147]. Unter 10 mg/kg wurde das Wachstum der Tumore um 77% und bei 100 mg/kg komplett gehemmt [147].

7.1.1. Instabilität der Resistenz

In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass die nachgewiesene Resistenz sich nur auf Zellen mit einer Passagezahl unter 62 bezog. In den Versuchen mit Zellen aus Passage 62 und 63 fiel auf, dass die vorher beobachteten Unterschiede im Bereich der niedrigeren Konzentrationen (3 μ M bis 11 μ M) geringer und nur noch bei 3 μ M, 6 μ M und 18 μ M signifikant waren und sich sowohl die Viabilitäten unter 11 μ M Pazopanib als auch die IC50-Werte beider Zelllinien nicht mehr signifikant unterschieden.

Hierbei könnte die Dauer der Kultivierung der Zellen und somit auch die Alterung als Ursache in Frage kommen, da die Caki-2 Paz in Passage 62/63 bereits seit mehreren Wochen in Kultur waren. Die Resistenzabnahme in den WST-1-Untersuchungen war neben der Dauer der Kultivierung möglicherweise auch von der Passagezahl der Zellen abhängig. Auf der Basis dieser Überlegung wurden für die Versuche möglichst niedrige Passagen sowie kurze Kulturzeiten angestrebt.

Ursächlich für die beobachtete Instabilität und Reversibilität der Resistenz der Caki-2 Paz könnten epigenetische Veränderungen sein, da für sogenannte „drug tolerant persisters“ u.a.

im Lungenkarzinom und der T-ALL gezeigt werden konnte, dass deren Resistenz reversibel ist und durch das Absetzen des Medikaments eine Resensitivierung auftritt, wobei die zugrundeliegenden Veränderungen epigenetisch bedingt sind [141,244].

Auch die Art und Weise der Etablierung könnte einen Einfluss auf die Stabilität der Resistenz gehabt haben. Um eine resistente Zelllinie zu etablieren, kann laut Xavier et al. entweder die Konzentration kontinuierlich gesteigert, die Konzentration ein zweites Mal erhöht und dann beibehalten oder die Zellen permanent mit einer gleichbleibenden Konzentration behandelt werden, wobei die Startkonzentration sehr unterschiedlich sein kann (IC20, IC50 oder nicht-toxische Konzentrationen) [310]. Außerdem kann das Medikament entweder kontinuierlich oder pulsatil (für kurze Zeit) appliziert werden [310].

In der betrachteten Literatur zur exosomalen Resistenzübertragung arbeiteten viele der Gruppen bei der Etablierung der resistenten Zelllinie mit einer Steigerung der Konzentration (siehe bspw. [160,264,271,323]). Im Unterschied dazu wurden die resistenten Zellen in der hier vorliegenden Arbeit durch die permanente Applikation der IC50 der Wildtypzellen etabliert. Auch Liu et al. ebenso wie Wei et al. applizierten nur eine Konzentration, wobei die Etablierung deutlich länger dauerte (6 Monate bzw. 15 Monate gegenüber 3 Monaten bei Caki-2 Paz) und nicht genau hervorgeht, ob es sich dabei um die IC50 handelte [159,300].

Diese Unterschiede in der Etablierung könnten sich möglicherweise auf die Stabilität der Resistenz und damit auch auf deren Übertragbarkeit auswirken.

7.2. Exosomencharakterisierung

Um die Reinheit der Exosomenisolation nachzuweisen, wurde ein Western Blot durchgeführt. CD9 und CD63 sind Tetraspanine, die besonders häufig in der exosomalen Membran gefunden werden, weshalb sie als exosomale Marker eingesetzt werden [3]. Neben CD63 gehören Alix und Syntenin ebenfalls zu den 20 häufigsten in Exosomen gefundenen Proteinen [12,129,289] und sind unter anderem in die Biogenese der Exosomen involviert [12].

Mit dem Nachweis der exosomalen Marker Alix, Syntenin, CD63 und CD9 [58,165] in den Exosomenlysaten wurde das Vorhandensein der Exosomen bestätigt.

GM-130 ist Teil der cis-Golgi-Matrix [198] der Zellen und dient deshalb als Reinheitskontrolle für die Exosomenisolation [56]. Da es nur in den Zelllysaten, nicht aber in den Exosomenlysaten detektierbar war, konnte eine zelluläre Kontamination ausgeschlossen werden.

Zur Bestimmung von Größe und Konzentration wurde eine Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) durchgeführt. Die Exosomen der Caki-2 WT und der Caki-2 Paz lagen mit ihrer Partikelgröße im charakteristischen Bereich für Exosomen und es zeigten sich keine signifikanten Größenunterschiede. Sowohl der Mittelwert der Konzentrationen der Exosomen der beiden Zelllinien als auch der Mittelwert der Zellzahl pro Triple flask unterschieden sich nicht signifikant, sodass beide Zelllinien etwa gleich viele Exosomen pro ml produzierten. Die

Zellzahl ist hierbei jedoch nicht als absolut zu betrachten, sondern nur als Näherungswert, da die Triple flasks aufgrund ihres 3-lagigen Aufbaus die Trypsinierung erschweren und ein Teil der Zellen in den Flasks zurückbleibt. Dennoch halten wir eine Normalisierung der Exosomenkonzentration auf die Zellzahl für wichtig, da es allein durch eine höhere Teilungsrate und damit der Zelldichte und -menge zu Unterschieden in der Menge der Exosomen kommen kann, die aber nicht direkt eine höhere Produktion von Exosomen pro Zelle bedeuten muss.

7.3. Exosomeninternalisierung

Durch die intrazelluläre Lage der Exosomen in der Fluoreszenzmikroskopie wurde ihre Aufnahme durch die Caki-2 WT nachgewiesen.

Ein Nachteil der Nachweismethode der Exosomeninternalisierung mittels PKH26 ist die mögliche Anfärbung nicht-exosomaler Strukturen, wie bspw. Proteine, Lipoproteine [268] oder aber die Bildung von PKH26-Nanopartikeln, die exosomal imponieren können [213]. Außerdem kann sich die Färbung mittels PKH-Farbstoffen auch auf die Größe der Exosomen auswirken [52]. Dementsprechend sollte bei der Beurteilung der Experimente auch eine solche Artefaktbildung immer berücksichtigt werden. Alternativ könnte die Exosomenmarkierung auch durch die stabile zelluläre Expression exosomenspezifischer Marker, die an fluoreszierende Moleküle gekoppelt sind (z.B. CD63-GFP) [74,184,226] oder durch die Markierung der Plasmamembran (bspw. mittels PalmGFP oder PalmtmTomato) erfolgen [148].

7.4. Resistenzübertragung

Nach dem erfolgreichen Nachweis der Resistenz, der Exosomenisolation sowie der Exosomeninternalisierung konnten die Experimente zur Resistenzübertragung durchgeführt werden. Bei allen Functional Assays wurden jeweils 2 Normalisierungen verwendet. Die erste Normalisierung erfolgte zur internen DMSO-Kontrolle, die jeweils die gleiche Vorbehandlung mit Exosomen oder PBS erhalten hatte, sodass dadurch Unterschiede wie die Zellzahl oder verschiedene Wachstumsgeschwindigkeiten ausgeglichen wurden und sich die Zellen nur in den Vorbehandlungen mit Exosomen unterschieden. Die zweite Normalisierung erfolgte zu den Caki-2 WT unter DMSO, die mit 8 µg/ml oder 20 µg/ml WT-Exosomen vorbehandelt worden waren, sodass hierbei die Unterschiede zwischen den Exosomen der beiden Zelllinien im direkten Vergleich gezeigt werden konnten. Diese zweite Normalisierung war notwendig, um eine etwaige Beeinflussung der Ergebnisse durch die parakrine Exosomenübertragung zu überprüfen und die Versuchsbedingungen der Kontroll- und Versuchsgruppe aneinander anzugleichen.

Im Functional Assay 1 konnte durch die Behandlung mit den Exosomen (unabhängig von welchen Zellen diese stammen) keine Veränderung der Viabilität erreicht werden. Auch im direkten Vergleich der Exosomen beider Zelllinien konnte hier keine Veränderung der Viabilität festgestellt werden. Ein dosisabhängiger Effekt der Exosomen wurde ebenfalls nicht

beobachtet. In diesem ersten Versuch konnte die Resistenz nicht auf die Wildtypzellen übertragen werden.

Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass die Exosomen von Zellen der Passage 63 stammten, da in den Resistenztests gezeigt wurde, dass die Resistenz dieser Zellen nicht mehr so stark ausgeprägt ist wie jene der niedrigeren Passagen. Um diesen Effekt auszuschließen, wurden die beiden anderen Functional Assays mit Exosomen von Zellen der Passage 60 und 57 durchgeführt.

Auch im 3. Functional Assay konnte die Vorbehandlung mit Exosomen die Viabilität nicht steigern. Die resistenten Zellen zeigten hier im Vergleich jedoch auch keine höhere Viabilität als die Wildtypzellen. In der Zellkultur fiel bei der regelmäßigen Mikroskopie zum Zeitpunkt dieses Experiments auf, dass die resistenten Zellen gegenüber den sensitiven Zellen wesentlich langsamer wuchsen, wohingegen jene sensitiven ein sehr starkes Wachstum zeigten. Dieser Unterschied kann dazu geführt haben, dass die Zellen trotz Resistenz weniger proliferierten als die Wildtypzellen unter 11 μM Pazopanib. Da die resistenten Zellen zu diesem Zeitpunkt keine gesteigerte Viabilität gegenüber den WT-Zellen aufwiesen, wäre dies auch eine mögliche Erklärung, weshalb auch ihre Exosomen keine Viabilitätssteigerung erreichen konnten. Wie bereits beim ersten Functional Assay war auch hier keine Veränderung der Viabilität unter 11 μM Pazopanib durch die Vorbehandlung mit den Paz-Exosomen gegenüber den WT-Exosomen zu erreichen. Somit konnte auch in diesem Experiment die Übertragung der Resistenz durch Exosomen nicht belegt werden.

Das zweite Functional Assay stellt hierbei einen Ausreißer dar. Zum einen liegen die Viabilitäten mit Werten über 86% höher als in den beiden anderen Experimenten und zum anderen ist hier ein geringfügiger Anstieg der Viabilität durch die Vorbehandlung mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Exo-Paz gegenüber der Behandlung mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Exo-WT zu erkennen. Gegenüber den unbehandelten (PBS-behandelten) Zellen besteht jedoch kein Unterschied. Betrachtet man die Effekte der Exosomen der verschiedenen Zelllinien in diesem Versuch, so unterscheiden sich die mit WT-Exosomen und mit 8 $\mu\text{g/ml}$ Paz-Exosomen behandelten Zellen in ihrer Viabilität nicht. In diesem Experiment konnte die hohe Konzentration der Paz-Exosomen eine Steigerung der Viabilität erreichen.

7.4.1. Einordnung der Ergebnisse der Functional Assays

Die Versuche 1 und 3 weisen eine ähnliche Tendenz auf. In beiden Versuchen konnte keine der Vorbehandlungen eine Veränderung der Viabilität induzieren. Daraus lässt sich schließen, dass in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden konnte, dass die Resistenz über Exosomen auf sensitive Zellen übertragbar ist. Hierfür kommen mehrere Ursachen in Betracht. Einerseits wurde während der Resistenztests zu Beginn der Arbeit festgestellt, dass die Resistenz der Caki-2 Paz nur in niedrigen Passagen (≤ 61) signifikant ist. Mit ansteigender Passage nahmen die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien ab, sodass die Resistenz

somit nicht mehr stabil war. Aufgrund der begrenzten Menge an vorhandenen niedrigen Passagen der aufwendig etablierten Caki-2 Paz konnten nicht bei allen Functional Assays Exosomen von Zellen mit einer Passage unter 62 verwendet werden, was eine mögliche Erklärung für den ausbleibenden Effekt der Exo-Paz in Functional Assay 1 bietet. Gleichwohl konnte auch mit Exosomen von Zellen der Passage 57 in Functional Assay 3 kein Effekt nachgewiesen werden.

Daraus ergibt sich wiederum die Frage, ob die beobachtete Abnahme der Resistenz in den höheren Passagen tatsächlich von der Passage abhängig ist oder vielmehr von der Zeit, über die sich die Zellen für den jeweiligen Versuch in Kultur befanden (ca. 4 Wochen beim Functional Assay), da diese Zeit bei allen Versuchen zur Resistenzübertragung ungefähr gleich lang war. Dies würde erklären, warum auch bei Passage 57 kein Effekt der Exosomen gefunden wurde.

Andererseits gilt es zu bedenken, dass während der Versuche große Schwankungen in der Wirkung des Pazopanibs auffielen. Während zu Beginn der Experimente die Viabilität der Caki-2 WT in den Resistenztests im Mittelwert bei 48,4% unter 11 μ M Pazopanib lag, lag sie in den ersten beiden Functional Assays und den Medikamententests im Mittelwert bei 82,3%, womit ein signifikanter Unterschied in der Wirkung bestand. Um zu verhindern, dass durch verschiedene Chargen Unterschiede in der Wirkung auftreten, wurde hierzu jeweils dieselbe Charge des Medikaments verwendet, wobei sich die Versuche über einen Zeitraum von etwa 4 Monaten erstreckten. Somit stellt sich die Frage, inwiefern die errechnete und applizierte Pazopanibkonzentration von 11 μ M, mit der die Caki-2 Paz dauerbehandelt wurden, tatsächlich 11 μ M betrug oder ob im Verlauf der wochenlangen Zellkultur die Wirkung des Pazopanibs trotz Lagerung bei -20°C oder -80°C abnahm. Da die Zeit von Beginn der Aufzucht der Zellen für die Exosomenisolation bis zum Ende des Functional Assays jeweils in etwa 4 Wochen betrug, ist der Zeitfaktor aufgrund einer möglichen Abnahme der Wirkung des Medikaments nicht zu vernachlässigen. Bezüglich der Zeitspanne, über die Pazopanib HCl in Lösung gelagert werden kann, widersprechen sich verschiedene Hersteller [180,237]. Während Selleckchem im Produktdatenblatt für das gelöste Medikament eine Haltbarkeit von 2 Jahren bei -80°C angibt, beschreibt MedchemExpress hier lediglich 6 Monate bei -80°C und nur einen Monat bei -20°C [180,237].

Auch in der Anwendung bei Patient*innen unterlag das Pazopanib neben einer medianen absoluten oralen Bioverfügbarkeit von nur 21,4% (13,5%-38,9%) [55] intra- sowie interindividuellen Schwankungen [51,114,288]. Pazopanib weist zwar eine hohe Permeabilität auf, aber auch eine geringe Löslichkeit im wässrigen Milieu bei pH 1 und ist bei pH-Werten über 4 unlöslich [282]. Dies erklärt, weshalb die Einnahme von PPIs wie Esomeprazol die Wirkung des Pazopanibs reduzieren [269]. Umgekehrt kann aufgrund der Metabolisierung über CYP3A4 beispielsweise durch die Einnahme von Ketokonazol der Wirkspiegel deutlich

steigen [269]. Die beschriebene geringe Löslichkeit deckt sich auch mit der eigenen Beobachtung, dass bei Versuchen mit Pazopanib HCl eines anderen Herstellers mikroskopisch bereits bei einer Konzentration von 18 μM Kristalle auftraten.

Ein weiteres Argument, weshalb die Resistenz in 2 von 3 Experimenten nicht übertragbar war, könnte auch in dem Vorgehen bei der Exosomenisolation begründet sein.

Unter Medium mit 10% ED-FCS verhalten sich die Zellen anders als unter nicht EV-depletiertem Medium, was unter anderem darin ersichtlich wird, dass sich die Depletion der Exosomen auf die Migration von Lungenkarzinomzellen [247], aber auch die Proliferation und Differenzierung von Myoblasten [6], sowie die Wachstumsrate verschiedener Zelllinien auswirkt [64]. Um zu vermeiden, dass die Caki-2 Paz, die aufgrund der permanenten Behandlung mit 11 μM Pazopanib schon langsam wuchsen, durch die gleichzeitige Applikation von Medium mit 10% ED-FCS und 11 μM Pazopanib noch langsamer wuchsen und damit innerhalb der 72 h, die im Protokoll der Exosomenisolation vorgesehen waren, keine Konfluenz in den Triple flasks erreichen konnten, wurden die Caki-2 Paz für die 72 Stunden der ED-FCS-Gabe nicht mit Pazopanib behandelt. In Anbetracht der beobachteten Instabilität der Resistenz hat diese medikamentenfreie Zeit möglicherweise bereits ausgereicht, um die Resistenz der Caki-2 Paz zu schwächen und dadurch eventuell verhindert, dass die Exosomen eine Resistenz übertragen konnten. Eine in diese Richtung deutende Beobachtung machten auch Gotink et al., deren pazopanibresistente 786-O-Zellen bereits eine Woche nach Absetzen des Medikaments die Resistenz verloren [88]. Bezüglich des genauen Vorgehens in der Applikation des Medikaments vor der Exosomenisolation finden sich jedoch kaum Angaben in der Literatur. Manche Gruppen schreiben, dass das Medikament mehrere Tage oder sogar zwei Wochen vor Beginn der Experimente abgesetzt wurde, wobei hierbei nicht weiter spezifiziert wird, ob dies auch bei der Exosomenisolation der Fall war (siehe bspw. [126,166,214,323]).

Neben dem Vorgehen bezüglich der Applikation des Medikaments bei der Isolation könnte auch die Zentrifugationsgeschwindigkeit das Ergebnis beeinflusst haben. Alle Exosomenisolationen wurden mit dem Festwinkelrotor Ti70 mit einer Geschwindigkeit von 40.000 rpm durchgeführt. Bei 40.000 rpm wirken auf die Röhrchen in dem Bereich, in dem später das Pellet zu finden ist 165.000 x g (vergleiche Herstellerangaben [15]). Für die Exosomenisolation werden je nach Isolationsprotokoll bei der Ultrazentrifugation Kräfte zwischen 100.000 und 200.000 x g eingesetzt [10,143,275]. Betrachtet man das Vorgehen anderer Gruppen, die ebenfalls Experimente zur Resistenzübertragung durchführten, so findet man häufig, dass die Ultrazentrifugation bei 100.000 x g durchgeführt wird [160,166,175,317,323,329]. Andererseits isolierten Azuma et al. die Exosomen ebenfalls bei höheren Zentrifugalkräften (150.000 x g) und konnten die Resistenzübertragung über Exosomen gegenüber Gefitinib zeigen [11]. Hierbei stellt sich die Frage, ob sich die

unterschiedlichen Zentrifugalkräfte möglicherweise auch auf die Funktionalität und Intaktheit der Exosomen und somit die Ergebnisse der hier gezeigten Functional Assays auswirken. Linares et al. zeigten, dass bereits bei der Ultrazentrifugation mit 100.000 x g Exosomenaggregate auftreten, was wiederum Einfluss auf die Exosomenkonzentration, die Größe sowie die biochemische Zusammensetzung haben kann [157]. Mol et al. untersuchten den Einfluss der Isolationsmethode (Ultrazentrifugation oder Größenausschluss-Chromatographie) auf die Exosomenfunktionalität, wobei sie feststellten, dass die Funktionalität der Exosomen, die mittels Größenausschluss-Chromatographie (engl.: size exclusion chromatography (SEC)) isoliert wurden, höher war als die Funktionalität derer, die mittels Ultrazentrifugation isoliert wurden [189].

Eine weitere Ursache könnte auch in der Dauer der Exosomenstimulation oder der Konzentration der applizierten Exosomen begründet sein. Eventuell könnte durch eine längere Stimulation oder eine höhere Konzentration doch ein Effekt beobachtet werden.

Ein solcher konzentrationsabhängiger Effekt wurde von Yang et al. und von Zhuang et al. beobachtet [317,336]. Yang et al. inkubierten die sensitiven Zellen für 24 Stunden mit verschiedenen Exosomenmengen (25 µg/ 50 µg/ 100 µg) in der 6-Well-Platte und behandelten die Zellen anschließend mit Adriamycin für 48 Stunden, wobei sie eine Abnahme der Apoptoserate mit steigender Konzentration feststellten [317]. Bei Zhuang et al. wurden die Zellen gleichzeitig mit der Applikation von Cisplatin mit verschiedenen Exosomenkonzentrationen (25, 50, 100, 200 sowie 300 µg/ml) behandelt, wobei auch hier die Viabilität mit steigender Konzentration und Zeit anstieg [336].

Gegen die Applikation einer höheren Konzentration spricht jedoch, dass die Zellen so möglicherweise mit unphysiologisch hohen Exosomenkonzentrationen behandelt würden. Welche Exosomenkonzentration jedoch physiologisch ist, lässt sich nur schwer beurteilen, da neben Tumorzellen auch viele andere Zellen Exosomen produzieren [221] (bspw. dendritische Zellen [340], Thrombozyten [101], Muskelzellen [200], Adipozyten [45]), was in den in-vitro-Experimenten dieser Arbeit durch die reine Kultur der Tumorzellen nicht darstellbar ist. Jing et al. nutzten beispielsweise in ihren Experimenten zur Cisplatinresistenz des Magenkarzinoms Exosomenkonzentrationen von 200 µg/ml, jedoch applizierten sie diese nur für 24h [126]. Auch Corcoran et al. nutzten 20 µg Exosomen, was unter der theoretischen Annahme eines Volumens von 100 µl in der 96-Well-Platte einer Konzentration von 200 µg/ml entspräche, wobei auch hier nur einmal stimuliert wurde und Docetaxel gleichzeitig mit den Exosomen verabreicht wurde [46]. Liu et al. hingegen stimulierten in ihren Versuchen zur Tamoxifenresistenz des Mamma-Karzinoms die Zellen über 9 Tage mit Exosomen und inkubierten diese dann über 72h mit verschiedenen Tamoxifenkonzentrationen [159]. Bezüglich der applizierten Exosomenkonzentration und wie häufig die Zellen über die 9 Tage stimuliert wurden, finden sich in der Publikation jedoch keine Angaben [159]. Hisakane et al.

verwendeten in ihrer Publikation 100 µg/ml Exosomen von resistenten Zellen, wobei auch hier die Angabe zur Häufigkeit und Dauer der Exosomenstimulation fehlen [106]. Torreggiani et al. arbeiteten mit 1,5 µg Exosomen [276]. Da die Versuche in der 96-Well-Platte durchgeführt wurden, jedoch keine Angabe zu den Volumina pro Well gemacht wurden, entsprechen die 1,5 µg unter der Annahme eines Volumens von 100 µl einer Konzentration von 15 µg/ml und bei 200 µl 7,5 µg/ml, womit beide Konzentrationen in einem ähnlichen Bereich liegen, wie in der hier vorliegenden Dissertation (8 µg/ml und 20 µg/ml) [276]. Die Zellen wurden hier bereits 4 Stunden nach der Exosomenstimulation mit Doxorubicin in verschiedenen Konzentrationen für 72 h behandelt [276]. Auch He et al. arbeiteten in ihren Versuchen mit einer Exosomenkonzentration von 20 µg/ml, wobei die Stimulation über 48h erfolgte [100].

Anhand dieser Beispiele wird ersichtlich, dass sich die Studien sowohl in der Exosomenkonzentration als auch der Stimulationsdauer unterscheiden, wenn diese Angaben überhaupt vorhanden sind (siehe oben).

Dennoch stellt sich die Frage, ob Experiment 2 tatsächlich als Ausreißer zu werten ist oder ob eine Resistenzübertragung möglich ist, nur eben zu anderen Bedingungen als bei Versuch 1 und 3. Der Hauptunterschied bei diesem Versuch lag in der geringen Wirkung des Pazopanibs. Betrachtet man die Viabilitätskurve der Resistenztests, so fällt auf, dass diese für die Caki-2 Paz im Bereich der niedrigen Pazopanibkonzentrationen (3 µM, 6 µM) bei Viabilitäten von 122% bzw. 123% liegt und somit eine signifikante Steigerung des Überlebens gegenüber den WT-Zellen zeigt. Unter der Annahme, dass die Pazopanibkonzentration bei Versuch 2 in eben diesem Konzentrationsbereich lag, in dem die resistenten Zellen einen signifikanten Überlebensvorteil aufweisen, könnte der Anstieg der Viabilität unter der hohen Exosomenkonzentration der Exo-Paz auch bedeuten, dass die Exosomen eine Resistenz für diesen Konzentrationsbereich übertragen. Sinnvoll wäre dementsprechend, in zukünftigen Experimenten diese Hypothese zu überprüfen, indem anstelle der Testung unter 11 µM die Viabilität unter 3 µM oder 6 µM untersucht wird. Somit wäre Versuch 2 nicht der Ausreißer, sondern eventuell der Ausgangspunkt einer Optimierung des Versuchsaufbaus unter Berücksichtigung der Eigenschaften der Zelllinie und des Medikaments.

Eine ähnliche Tendenz zeigt sich auch bei Torreggiani et al. [276]. Unter 1 ng/ml Doxorubicin überschritt die Viabilität der Wildtypzellen, die mit Exosomen der resistenten Zelllinie behandelt wurden, die Viabilität der Zellen ohne Doxorubicinbehandlung und insbesondere bei 10 ng/ml bestand eine signifikant höhere Viabilität durch die Vorbehandlung mit den Exosomen der resistenten Zellen im Vergleich zur Behandlung mit Exosomen der Wildtypzellen und der nicht-vorbehandelten Zellen [276]. Das Interessante hierbei ist, dass die Dosis, unter der die resistenten Zellen permanent kultiviert wurden, bei 30 ng/ml Doxorubicin lag und sich bei dieser Konzentration die Viabilitäten unabhängig von der Vorbehandlung nicht signifikant unterschieden [276]. Demnach ist auch hier die Steigerung der Viabilität insbesondere für

Konzentrationen unterhalb der permanenten Erhaltungsdosis der resistenten Zellen stärker ausgeprägt [276]. Bei 60 ng/ml waren die Unterschiede wieder signifikant [276], sodass es in diesem Zusammenhang interessant wäre, auch im vorliegenden Modell der Dissertation eine höhere Konzentration des Pazopanibs in zukünftigen Versuchen zu überprüfen.

Bei Azuma et al. führte die Behandlung mit den Exosomen der resistenten Zelllinie zu einer signifikant höheren Proliferationsrate der Wildtypzellen unter Behandlung mit Gefitinib [11]. Der Effekt auf die Proliferation war jedoch auch hier nur bei 0,1 μM sowie 1 μM Gefitinib signifikant und bei 10 μM nicht signifikant [11]. Betrachtet man die IC_{50} der resistenten Zelllinie, so liegt diese mit 6,22 μM deutlich höher als die Konzentrationen für die eine signifikante höhere Proliferationsrate gezeigt wurde (0,1 μM und 1 μM) [11].

Neben all diesen Faktoren stellt sich auch die Frage, ob die Zelllinie Caki-2 für diese Fragestellung optimal war.

Bei Stamati et al. wiesen die Caki-2 unter Pazopanib sowohl als 3D-Tumoroide als auch in der 2D-Kultur eine höhere Viabilität als die 786-O-Zellen auf [258]. Eine ähnliche Beobachtung machten auch Miyake et al., die feststellten, dass die Zelllinie Caki-2 eine signifikant höhere IC_{50} für 5-Fluoruracil und auch Sorafenib aufwies als die ACHN- oder Caki-1-Zelllinie [185]. Dies macht deutlich, wie stark das Therapieansprechen auch von der jeweiligen Zelllinie bzw. dem Tumor abhängig ist. Rechnet man dies mit ein, so ergibt sich, dass zwar für die Zelllinie Caki-2 hier nicht gezeigt werden konnte, dass die Pazopanibresistenz über Exosomen übertragbar ist, dies jedoch für andere Zelllinien durchaus der Fall sein könnte, da sich diese womöglich in ihrem Ansprechen und auch Resistenzverhalten unterscheiden. Eine einzige Zelllinie ist nicht repräsentativ für alle Nierenzellkarzinome [306], insbesondere in Anbetracht dessen, dass es sich bei Nierenzellkarzinomen um heterogene Tumore handelt [75], weshalb die Hypothese, die in dieser Dissertation überprüft wurde, auch an weiteren Zelllinien untersucht werden sollte, um diese Heterogenität besser abbilden zu können.

Im direkten Vergleich der Tyrosinkinaseinhibitoren erwies sich Sunitinib angewandt auf verschiedene Zelllinien in-vitro bereits bei niedrigeren Konzentrationen als proliferationshemmend und konnte im Gegensatz zu Pazopanib auch die Apoptose in den Zellen auslösen [28]. Sunitinib wirkte hier im Gegensatz zu Pazopanib neben der Zytostase auch zytotoxisch [28]. 2022 erschien eine weitere Arbeit, die sich mit den Unterschieden von Pazopanib und Sunitinib im in-vitro-Modell befasste [2]. Sunitinib wies auch hier ein höheres zytotoxisches Potential bei deutlich niedrigeren Konzentrationen auf, wobei auch Pazopanib in einer ausreichend hohen und klinisch relevanten Konzentration zytotoxisch wirkte [2]. Im Vergleich wirkte Sunitinib jedoch selektiver auf die Tumorzellen, während Pazopanib auch auf die normalen Nierenzellen wirkte [2]. Während Sunitinib vor allem die intrazellulären Metabolite der Tumorzellen beeinflusste, beeinflusste Pazopanib die Metabolite bei den Tumorzellen überwiegend extrazellulär und extra- sowie intrazellulär bei den normalen Nierenzellen [2]. In

einer Untersuchung zur Kreuzresistenz der verschiedenen TKI, wurde für Pazopanib eine Kreuzresistenz in sunitinibresistenten Colonkarzinomzellen entdeckt, jedoch nicht bei sunitinibresistenten NZK-Zellen, wohingegen für Sorafenib keine Kreuzresistenz bei vorliegender Sunitinibresistenz bestand [88]. Während die Pazopanibresistenz hier schnell etabliert werden konnte, war dies für Sorafenib nicht möglich [88]. Ein weiterer Unterschied zwischen den Medikamenten zeigte sich darin, dass die pazopanibresistenten Zellen keine Kreuzresistenz zu anderen Medikamenten aufwiesen, während dies bei den sunitinibresistenten Zellen der Fall war [88].

Möglicherweise erklärt die unterschiedliche Wirkung der Medikamente in-vitro teilweise auch die Unterschiede zwischen der erfolgreichen Resistenzübertragung von Sunitinib [215] und Sorafenib [100] gegenüber der fehlenden Übertragbarkeit der Resistenz gegen Pazopanib in der vorliegenden Arbeit.

Gemäß den Empfehlungen der S3-Leitlinie zu adulten Weichgewebesarkomen stellt Pazopanib eine mögliche Folgetherapie nach Versagen der Erstlinientherapie für die lokal nicht therapierbare, lokale oder metastasierte Erkrankung dar [154]. Neben der Forschung zu Pazopanib im Nierenzellkarzinom (siehe oben) gibt es dementsprechend auch Publikationen zu Weichgewebesarkomen (vergleiche beispielsweise [135,149,313]).

Unter anderem erschien 2018 eine Publikation von Shiozawa et al., die sich dem Problem der Pazopanibresistenz des synovialen Sarkoms annahm [250]. In ihren Experimenten isolierten sie die Exosomen der Zelllinie, die von allen vier ausgewählten die höchste IC50 gegenüber Pazopanib aufwies und stimulierten damit die drei sensitiveren Zelllinien [250]. Eine signifikante Steigerung der IC50 trat nur bei der Zelllinie von der die Exosomen stammten und bei einer weiteren Zelllinie auf [250]. Auf die anderen beiden Zelllinien hatte die Vorbehandlung keine signifikante Auswirkung [250]. Im Rahmen dieses Forschungsprojektes stießen die Autor*innen auf die miR-761, die unter der Pazopanibbehandlung der resistenten Zellen hochreguliert ist und möglicherweise zu dieser Resistenz beiträgt [250]. Als fundamentaler Unterschied zu der hier vorliegenden Dissertation basiert die Arbeit von Shiozawa et al. jedoch auf der Übertragung einer intrinsischen Resistenz, die nicht erst durch eine kontinuierliche Vorbehandlung mit Pazopanib entstand, sondern bereits vorhanden war [250]. Dies erschwert den direkten Vergleich der Versuche.

Im Gegensatz zu den beschriebenen Versuchen von Qu et al. [215] und He et al. [100] im Nierenzellkarzinom sowie Shiozawa et al. im synovialen Sarkom [250] war in der hier vorliegenden Dissertation die Resistenz nicht über Exosomen übertragbar. Zu den möglichen Gründen zählen, wie bereits diskutiert, die Instabilität der Resistenz der Caki-2 Paz mit zunehmender Passage, optimierbare Aspekte im methodischen Vorgehen (wie beispielsweise die Zentrifugalkraft), aber auch die verminderte Wirkung des Medikaments über die Zeit (siehe oben).

Auch wenn die Resistenz hier nicht übertragbar war, schmälert dies nicht die Relevanz der Versuche. An diesem Projekt wird vielmehr ersichtlich, welche potentiellen Probleme oder Fragen es bei der Planung, aber auch der Umsetzung solcher zukünftiger Versuche zu bedenken gibt und dass im Bereich der Forschung zu extrazellulären Vesikeln nach wie vor eine große Heterogenität herrscht, sei es bei der verwendeten Isolationsmethode, den verschiedenen Zentrifugationsschritten oder auch der Exosomencharakterisierung (Wahl der Methode, Anzahl der Antikörper...) [283]. Ein einheitlicheres Vorgehen aber auch detailliertere Angaben der Methoden in Publikationen, bspw. zum genauen Vorgehen bezüglich des Medikamentes bei der Exosomenisolation oder aber der Dauer und Häufigkeit der durchgeführten Exosomenstimulationen, könnten dazu beitragen, Versuche reproduzierbarer zu gestalten [82,211] und auch aus den Fehlern oder Problemen anderer Forschungsgruppen zu lernen.

Dennoch sollte auch in Zukunft weiter zu Exosomen geforscht werden. Neben den bereits genannten Funktionen liefern Exosomen auch potentielle Therapietargets [50,116,238], eignen sich zum Transport verschiedener Medikamente [81,230,334,337] und sind biokompatibel, nicht-toxisch sowie gering immunogen [333,335]. Yang et al. zeigten beispielsweise im Zebrafischmodell, dass Exosomen von Endothelzellen des Gehirns die Blut-Hirn-Schranke überwinden und dadurch Doxorubicin und Paclitaxel über diese Schranke transportieren können [318].

Vor dem Hintergrund, dass Pazopanib eine relativ geringe orale Bioverfügbarkeit hat [55], wäre es auch denkbar, dieses Medikament über Exosomen an die Zielzellen zu liefern, da bspw. für Curcumin gezeigt werden konnte, dass die Bioverfügbarkeit durch den Transport über Exosomen höher ist [4,262]. Exosomales Doxorubicin zeigte gegenüber der herkömmlichen Form eine geringere Kardiotoxizität, was eine Konzentrationssteigerung und dadurch auch eine Wirkungssteigerung ermöglichte [96]. Ebenso wies exosomal transportiertes Paclitaxel eine höhere Zytotoxizität als herkömmliches Paclitaxel bei resistenten und sensitiven Zellen auf [136].

Auch zur Pazopanibresistenz sollte weiter geforscht werden, um genauer deren Entstehung zu verstehen und dadurch sich ergebende Therapieansätze zu nutzen.

Wang et al. leisteten hierzu einen Beitrag, indem sie die Gankyrin/STAT3/CCL24/CCR3-Achse im Nierenzellkarzinom untersuchten und unter anderem zeigen konnten, dass durch die Blockade von CCR3 oder den Knockdown von Gankyrin, die Pazopanibresistenz in vivo aufgehoben werden konnte [296].

Für Knochen- und Weichgewebesarkome fanden Yamada et al. die lncRNA HAR1B, die als potentieller prädiktiver Biomarker bei der Pazopanibtherapie genutzt werden könnte [313].

Die intrinsische Resistenz des synovialen Sarkoms wurde von Lanzi et al. untersucht [149]. Hierbei identifizierten sie in der Zelllinie CME-1 den IGF1- und Insulinrezeptor als Vermittler

der AKT-Aktivierung und erreichten durch die Kombination von Pazopanib mit der dualen Blockade dieser Rezeptoren eine Sensitivierung gegenüber Pazopanib [149]. Für die MoJo-Zelllinie wurde die NRASQ61R-Mutation identifiziert und deren Relevanz für die Pazopanibresistenz durch die gleichzeitige Gabe von Pazopanib und die Blockade von MEK1/2 durch Trametinib und die dadurch auftretende Sensitivierung bestätigt [149].

Auch bei der erworbenen Resistenz des synovialen Sarkoms gegen Pazopanib wurde eine Verbindung zur gesteigerten Phosphorylierung von ERK1/2 hergestellt, sodass auch hier durch die Applikation von Trametinib eine partielle Resensitivierung auftrat [322].

Auch im Nierenzellkarzinom sollte folglich weiter zur Pazopanibresistenz und deren molekularen Grundlagen geforscht werden, wobei die vorliegende Dissertation einen soliden Ausgangspunkt liefert.

7.5. Schlussfolgerung und Ausblick

Die Resistenz der Caki-2 Paz konnte verifiziert, die IC₅₀ bei 16,1 µM bestimmt, die Qualität und Reinheit der Exosomenisolation mittels Western Blot und NTA nachgewiesen und die Aufnahme der Exosomen fluoreszenzmikroskopisch festgehalten werden.

Die Hypothese, dass die Pazopanibresistenz im Nierenzellkarzinom durch Exosomen induzierbar ist, konnte in der vorliegenden Dissertation nicht bestätigt werden.

Ein wichtiger Einflussfaktor des negativen Ergebnisses hierbei lag möglicherweise im Medikament selbst begründet. Die Wirksamkeit von Pazopanib erwies sich als stark hersteller- und chargenabhängig, woraus sich ergibt, dass auch bei zukünftigen Versuchen nach Möglichkeit nur eine Charge verwendet werden sollte, um solche Wirkungsschwankungen zu umgehen. Auch eine Optimierung der Formulierung und Stabilität des Pazopanibs könnte dementsprechend die Forschung erleichtern und eine stabilere Resistenz bei den Zelllinien ermöglichen.

Ausgehend von dieser Arbeit sollte eine Wiederholung der Versuche erfolgen. Hierbei könnte zum einen die Exosomenisolation bei 100.000 x g durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob sich dies auf die Funktionalität auswirkt. Außerdem könnte die Dauer der Exosomenstimulation ebenso wie die Exosomenkonzentration variiert werden. Zudem wäre es sinnvoll, beim Functional Assay die Viabilität unter verschiedenen Pazopanibkonzentrationen zu erfassen, um die im 2. Functional Assay gefundene Viabilitätssteigerung zu überprüfen. Auch die Überprüfung an einer anderen Zelllinie könnte in Erwägung gezogen werden, da die Resistenz der Caki-2 Paz mit steigender Passage abnahm und ein Effekt eventuell bei einer anderen Zelllinie gefunden werden könnte. Hierfür wäre jedoch die erneute Etablierung pazopanibresistenter Zellen nötig. Ebenso könnten Versuche erfolgen, in denen die Caki-2 Paz auch unter der Kultur mit ED-Medium mit 11 µM Pazopanib behandelt würden, um zu sehen, ob sich dies auf die Resistenzübertragung auswirkt.

Dieses Projekt verdeutlicht, wie essentiell die Etablierung einheitlicher methodischer Standards im Bereich der Forschung zu extrazellulären Vesikeln und Medikamentenresistenzen ist, da bereits geringfügige Abweichungen sich auf die Ergebnisse auswirken können.

Um die Prognose der Patient*innen im metastasierten Stadium zu verbessern, sollte folglich weiter zur Pazopanibresistenz und hier auch insbesondere zur Rolle der Exosomen geforscht werden, da diese Frage im Nierenzellkarzinom nach wie vor ungeklärt bleibt, die vorliegende Dissertation jedoch einen guten Ausgangspunkt für weitere Versuche liefert.

8. Literaturverzeichnis

1. Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC (2013) Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol* 113:1–11
2. Amaro F, Piscoiro C, Valente MJ, Bastos M de L, Guedes de Pinho P, Carvalho M, Pinto J (2022) Sunitinib versus Pazopanib Dilemma in Renal Cell Carcinoma: New Insights into the In Vitro Metabolic Impact, Efficacy, and Safety. *Int J Mol Sci* 23:9898
3. Andreu Z, Yáñez-Mó M (2014) Tetraspanins in Extracellular Vesicle Formation and Function. *Front Immunol* 5:442
4. Aqil F, Munagala R, Jeyabalan J, Agrawal AK, Gupta R (2017) Exosomes for the Enhanced Tissue Bioavailability and Efficacy of Curcumin. *AAPS J* 19:1691–1702
5. Arai E, Kanai Y (2011) Genetic and epigenetic alterations during renal carcinogenesis. *Int J Clin Exp Pathol* 4:58–73
6. Aswad H, Jalabert A, Rome S (2016) Depleting extracellular vesicles from fetal bovine serum alters proliferation and differentiation of skeletal muscle cells in vitro. *BMC Biotechnol* 16:32
7. ATCC (2021) Product sheet: Caki-2 (ATCC HTB-47) [Internet]. URL: <https://www.atcc.org/products/htb-47> (Zugriff am 01.06.2022)
8. Au Yeung CL, Co N-N, Tsuruga T, Yeung T-L, Kwan S-Y, Leung CS, Li Y, Lu ES, Kwan K, Wong K-K, Schmandt R, Lu KH, Mok SC (2016) Exosomal transfer of stroma-derived miR21 confers paclitaxel resistance in ovarian cancer cells through targeting APAF1. *Nat Commun* 7:11150
9. Aung T, Chapuy B, Vogel D, Wenzel D, Oppermann M, Lahmann M, Weinhage T, Menck K, Hupfeld T, Koch R, Trümper L, Wulf GG (2011) Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3. *Proc Natl Acad Sci* 108:15336–15341
10. Ayala-Mar S, Donoso-Quezada J, Gallo-Villanueva RC, Perez-Gonzalez VH, González-Valdez J (2019) Recent advances and challenges in the recovery and purification of cellular exosomes. *Electrophoresis* 40:3036–3049
11. Azuma Y, Yokobori T, Mogi A, Yajima T, Kosaka T, Iijima M, Shimizu K, Shirabe K, Kuwano H (2020) Cancer exosomal microRNAs from gefitinib-resistant lung cancer cells cause therapeutic resistance in gefitinib-sensitive cells. *Surg Today* 50:1099–1106
12. Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A, Ivarsson Y, Depoortere F, Coomans C, Vermeiren E, Zimmermann P, David G (2012) Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* 14:677–685

13. Baldewijns MML, van Vlodrop IJH, Schouten LJ, Soetekouw PMMB, de Bruïne AP, van Engeland M (2008) Genetics and epigenetics of renal cell cancer. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer* 1785:133–155
14. Bebelman MP, Smit MJ, Pegtel DM, Baglio SR (2018) Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacol Ther* 188:1–11
15. Beckman Coulter, Inc. (2022) Type 70 Ti Rotor Manual- Instrument IFU, released: 19.08.2022 (Document Number: L5-TB-030.BD) [Internet]. URL: <https://www.beckman.de/search#q=337922&t=coveo-tab-techdocs> (Zugriff am 16.10.2022)
16. Bergers G, Hanahan D (2008) Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 8:592–603
17. Berridge M, Herst P, Tan A (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 11:127–152
18. Bianchi M, Sun M, Jeldres C, Shariat SF, Trinh Q-D, Briganti A, Tian Z, Schmitges J, Graefen M, Perrotte P, Menon M, Montorsi F, Karakiewicz PI (2012) Distribution of metastatic sites in renal cell carcinoma: a population-based analysis. *Ann Oncol* 23:973–980
19. Binenbaum Y, Fridman E, Yaari Z, Milman N, Schroeder A, Ben David G, Shlomi T, Gil Z (2018) Transfer of miRNA in Macrophage-Derived Exosomes Induces Drug Resistance in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Res* 78:5287–5299
20. Bolton DM, Wong P, Lawrentschuk N (2007) Renal cell carcinoma: imaging and therapy. *Curr Opin Urol* 17:337–340
21. Bommi-Reddy A, Almeciga I, Sawyer J, Geisen C, Li W, Harlow E, Kaelin WG, Grueneberg DA (2008) Kinase requirements in human cells: III. Altered kinase requirements in VHL^{-/-} cancer cells detected in a pilot synthetic lethal screen. *Proc Natl Acad Sci* 105:16484–16489
22. Brierley J, O'Sullivan B, Asamura H, Byrd D, Huang SH, Lee A, Piñeros M, Mason M, Moraes FY, Rösler W, Rous B, Torode J, van Krieken JH, Gospodarowicz M (2019) Global Consultation on Cancer Staging: promoting consistent understanding and use. *Nat Rev Clin Oncol* 16:763–771
23. Brill AS, Weinryb I (1967) Reactions of Horseradish Peroxidase with Azide. Evidence for a Methionine Residue at the Active Site *. *Biochemistry* 6:3528–3535
24. Brinton LT, Sloane HS, Kester M, Kelly KA (2015) Formation and role of exosomes in cancer. *Cell Mol Life Sci CMLS* 72:659–671
25. Broad Institute (o.J.) CAK12 DepMap Portal Cell Line Summary [Internet]. URL: https://depmap.org/portal/cell_line/ACH-000234?tab=mutation (Zugriff am 06.10.2022)

26. Byler TK, Bratslavsky G (2014) Hereditary renal cell carcinoma: genetics, clinical features, and surgical considerations. *World J Urol* 32:623–630
27. Caldwell GW, Yan Z, Lang W, Masucci JA (2012) The IC50 Concept Revisited. *Curr Top Med Chem* 12:1282–1290
28. Canter D, Kutikov A, Golovine K, Makhov P, Simhan J, Uzzo RG, Kolenko VM (2011) Are All Multi-targeted Tyrosine Kinase Inhibitors Created Equal? An In Vitro Study of Sunitinib and Pazopanib in Renal Cell Carcinoma Cell Lines. *Can J Urol* 18:5819–5825
29. Cao Y, E G, Wang E, Pal K, Dutta SK, Bar-Sagi D, Mukhopadhyay D (2012) VEGF exerts an angiogenesis-independent function in cancer cells to promote their malignant progression. *Cancer Res* 72:3912–3918
30. Capitanio U, Montorsi F (2016) Renal cancer. *The Lancet* 387:894–906
31. Capitanio U, Bensalah K, Bex A, Boorjian SA, Bray F, Coleman J, Gore JL, Sun M, Wood C, Russo P (2019) Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol* 75:74–84
32. Center for drug evaluation and research (2009) Summary Review for Regulatory Action [Internet]. URL: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2009/022465s000_SumR.pdf (Zugriff am 29.07.2022)
33. Chan LL-Y, Kuksin D, Laverty DJ, Saldi S, Qiu J (2015) Morphological observation and analysis using automated image cytometry for the comparison of trypan blue and fluorescence-based viability detection method. *Cytotechnology* 67:461–473
34. Chang W-H, Cerione RA, Antonyak MA (2021) Extracellular Vesicles and Their Roles in Cancer Progression. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2174:143–170
35. Chen G, Huang AC, Zhang W, Zhang G, Wu M, Xu W, Yu Z, Yang J, Wang B, Sun H, Xia H, Man Q, Zhong W, Antelo LF, Wu B, Xiong X, Liu X, Guan L, Li T, Liu S, Yang R, Lu Y, Dong L, McGettigan S, Somasundaram R, Radhakrishnan R, Mills G, Lu Y, Kim J, Chen YH, Dong H, Zhao Y, Karakousis GC, Mitchell TC, Schuchter LM, Herlyn M, Wherry EJ, Xu X, Guo W (2018) Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature* 560:382–386
36. Chenam A, Lau C (2018) Management of Small Renal Masses. In: Daneshmand S, Chan K (eds) *Genitourinary Cancers. Cancer Treatment and Research*. Springer International Publishing, Cham, pp 105-126
37. Cheng R, Zhang F, Li M, Wo X, Su Y-W, Wang W (2019) Influence of Fixation and Permeabilization on the Mass Density of Single Cells: A Surface Plasmon Resonance Imaging Study. *Front Chem* 7:588
38. Chittiboina P, Lonser RR (2015) Chapter 10 - Von Hippel–Lindau disease. In: Islam MP, Roach ES (eds) *Neurocutaneous Syndromes, Handbook of Clinical Neurology, Volume 132*. Elsevier, Edinburgh, pp 139-156

39. Choueiri TK, Motzer RJ (2017) Systemic Therapy for Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 376:354–366
40. Choueiri TK, Kaelin WG (2020) Targeting the HIF2–VEGF axis in renal cell carcinoma. *Nat Med* 26:1519–1530
41. Choueiri TK, Tomczak P, Park SH, Venugopal B, Ferguson T, Chang Y-H, Hajek J, Symeonides SN, Lee JL, Sarwar N, Thiery-Vuillemin A, Gross-Goupil M, Mahave M, Haas NB, Sawrycki P, Gurney H, Chevreau C, Melichar B, Kopyltsov E, Alva A, Burke JM, Doshi G, Topart D, Oudard S, Hammers H, Kitamura H, Bedke J, Perini RF, Zhang P, Imai K, Willemann-Rogerio J, Quinn DI, Powles T (2021) Adjuvant Pembrolizumab after Nephrectomy in Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 385:683–694
42. Chow W-H, Gridley G, Fraumeni JF, Järnholm B (2000) Obesity, Hypertension, and the Risk of Kidney Cancer in Men. *N Engl J Med* 343:1305–1311
43. Chow W-H, Dong LM, Devesa SS (2010) Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol* 7:245–257
44. Ciravolo V, Huber V, Ghedini GC, Venturelli E, Bianchi F, Campiglio M, Morelli D, Villa A, Mina PD, Menard S, Filipazzi P, Rivoltini L, Tagliabue E, Pupa SM (2012) Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy. *J Cell Physiol* 227:658–667
45. Clement E, Lazar I, Attané C, Carrié L, Dauvillier S, Ducoux-Petit M, Esteve D, Menneteau T, Moutahir M, Le Gonidec S, Dalle S, Valet P, Burlet-Schiltz O, Muller C, Nieto L (2020) Adipocyte extracellular vesicles carry enzymes and fatty acids that stimulate mitochondrial metabolism and remodeling in tumor cells. *EMBO J* 39:e102525
46. Corcoran C, Rani S, O'Brien K, O'Neill A, Prencipe M, Sheikh R, Webb G, McDermott R, Watson W, Crown J, O'Driscoll L (2012) Docetaxel-Resistance in Prostate Cancer: Evaluating Associated Phenotypic Changes and Potential for Resistance Transfer via Exosomes. *PLoS ONE* 7:e50999
47. Crenshaw BJ, Gu L, Sims B, Matthews QL (2018) Exosome Biogenesis and Biological Function in Response to Viral Infections. *Open Virol J* 12:134–148
48. Czyzyk-Krzeska MF, Landero Figueroa JA, Gulati S, Cunningham JT, Meller J, Shamsael B, Vemuri B, Plas DR (2021) Molecular and Metabolic Subtypes in Sporadic and Inherited Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Genes* 12:388
49. Dabestani S, Thorstenson A, Lindblad P, Harmenberg U, Ljungberg B, Lundstam S (2016) Renal cell carcinoma recurrences and metastases in primary non-metastatic patients: a population-based study. *World J Urol* 34:1081–1086
50. Datta A, Kim H, McGee L, Johnson AE, Talwar S, Marugan J, Southall N, Hu X, Lal M, Mondal D, Ferrer M, Abdel-Mageed AB (2018) High-throughput screening identified

- selective inhibitors of exosome biogenesis and secretion: A drug repurposing strategy for advanced cancer. *Sci Rep* 8:8161
51. de Wit D, van Erp NP, den Hartigh J, Wolterbeek R, den Hollander-van Deursen M, Labots M, Guchelaar H-J, Verheul HM, Gelderblom H (2015) Therapeutic Drug Monitoring to Individualize the Dosing of Pazopanib: A Pharmacokinetic Feasibility Study. *Ther Drug Monit* 37:331–338
 52. Dehghani M, Gulvin SM, Flax J, Gaborski TR (2020) Systematic Evaluation of PKH Labelling on Extracellular Vesicle Size by Nanoparticle Tracking Analysis. *Sci Rep* 10:9533
 53. Delahunt B, Cheville JC, Martignoni G, Humphrey PA, Magi-Galluzzi C, McKenney J, Egevad L, Algaba F, Moch H, Grignon DJ, Montironi R, Srigley JR, Panel TM of the IRT (2013) The International Society of Urological Pathology (ISUP) Grading System for Renal Cell Carcinoma and Other Prognostic Parameters. *Am J Surg Pathol* 37:1490–1504
 54. Delorme-Axford E, Donker RB, Mouillet J-F, Chu T, Bayer A, Ouyang Y, Wang T, Stolz DB, Sarkar SN, Morelli AE, Sadovsky Y, Coyne CB (2013) Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:12048–12053
 55. Deng Y, Sychterz C, Suttle AB, Dar MM, Bershas D, Negash K, Qian Y, Chen EP, Gorycki PD, Ho MYK (2013) Bioavailability, metabolism and disposition of oral pazopanib in patients with advanced cancer. *Xenobiotica* 43:443–453
 56. Ding X, Zhang S, Deng X, Qiang J (2021) Serum Exosomal lncRNA DLX6-AS1 Is a Promising Biomarker for Prognosis Prediction of Cervical Cancer. *Technol Cancer Res Treat* 20:1533033821990060
 57. Donskov F, Xie W, Overby A, Wells JC, Fracon AP, Sacco CS, Porta C, Stukalin I, Lee J-L, Koutsoukos K, Yuasa T, Davis ID, Pezaro C, Kanavaras R, Bjarnason GA, Sim H-W, Rathi N, Kollmannsberger CK, Canil CM, Choueiri TK, Heng DY (2020) Synchronous Versus Metachronous Metastatic Disease: Impact of Time to Metastasis on Patient Outcome—Results from the International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium. *Eur Urol Oncol* 3:530–539
 58. Doyle LM, Wang MZ (2019) Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells* 8:727
 59. Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJP, Hole P, Carr B, Redman CWG, Harris AL, Dobson PJ, Harrison P, Sargent IL (2011) Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomed* 7:780–788
 60. Du Z, Lovly CM (2018) Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol Cancer* 17:58

61. Duran I, Lambea J, Maroto P, González-Larriba JL, Flores L, Granados-Principal S, Graupera M, Sáez B, Vivancos A, Casanovas O (2017) Resistance to Targeted Therapies in Renal Cancer: The Importance of Changing the Mechanism of Action. *Target Oncol* 12:19–35
62. EAU Guidelines Office (2022) EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Amsterdam 2022 [Internet]. URL: <https://uroweb.org/guidelines/renal-cell-carcinoma/chapter/diagnostic-evaluation> (Zugriff am 13.06.2022)
63. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, Herausgeber (2004) World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. IARC Press, Lyon
64. Eitan E, Zhang S, Witwer KW, Mattson MP (2015) Extracellular vesicle–depleted fetal bovine and human sera have reduced capacity to support cell growth. *J Extracell Vesicles* 4:26373
65. Ellis LM, Hicklin DJ (2008) VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer* 8:579–591
66. EMA (2021) Votrient: EPAR- Product Information [Internet]. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/votrient> (Zugriff am 27.07.2022)
67. Escudier B, Porta C, Bono P, Powles T, Eisen T, Sternberg CN, Gschwend JE, De Giorgi U, Parikh O, Hawkins R, Sevin E, Négrier S, Khan S, Diaz J, Redhu S, Mehmud F, Cella D (2014) Randomized, Controlled, Double-Blind, Cross-Over Trial Assessing Treatment Preference for Pazopanib Versus Sunitinib in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma: PISCES Study. *J Clin Oncol* 32:1412–1418
68. Ficarra V, Galfano A, Mancini M, Martignoni G, Artibani W (2007) TNM staging system for renal-cell carcinoma: current status and future perspectives. *Lancet Oncol* 8:554–558
69. Figlin RA (1999) Renal cell carcinoma: management of advanced disease. *J Urol* 161:381–387
70. Filipe V, Hawe A, Jiskoot W (2010) Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. *Pharm Res* 27:796–810
71. Fogh J, Trempe G (1975) New Human Tumor Cell Lines. In: Fogh, J. (eds) *Human Tumor Cells in Vitro*. Plenum Press, New York, pp 115-141
72. Frank I, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H (2002) An Outcome Prediction Model for Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma Treated with Radical Nephrectomy Based on Tumor Stage, Size, Grade and Necrosis: The Ssign Score. *J Urol* 168:2395–2400

73. Gan CL, Dudani S, Heng DYC (2020) Prognostic and Predictive Factors in Metastatic Renal Cell Carcinoma: Current Perspective and a Look Into the Future. *Cancer J* 26:365–375
74. Garcia NA, Moncayo-Arlandi J, Sepulveda P, Diez-Juan A (2016) Cardiomyocyte exosomes regulate glycolytic flux in endothelium by direct transfer of GLUT transporters and glycolytic enzymes. *Cardiovasc Res* 109:397–408
75. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C (2012) Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N Engl J Med* 366:883–892
76. Gey MH (2015) *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
77. Gill IS, Aron M, Gervais DA, Jewett MAS (2010) Small Renal Mass. *N Engl J Med* 362:624–634
78. Gnarr JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, WeF MH, Lf H, Latif F, Liu S (1994) Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* 7:85–90
79. Gobé G, Rubin M, Williams G, Sawczuk I, Buttyan R (2002) Apoptosis and Expression of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax in Renal Cell Carcinomas. *Cancer Invest* 20:324–332
80. Goel HL, Mercurio AM (2013) VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer* 13:871–882
81. Gomari H, Forouzandeh Moghadam M, Soleimani M, Ghavami M, Khodashenas S (2019) Targeted delivery of doxorubicin to HER2 positive tumor models. *Int J Nanomedicine Volume* 14:5679–5690
82. Goodman SN, Fanelli D, Ioannidis JPA (2016) What does research reproducibility mean? *Sci Transl Med* 8:341ps12
83. Gordan JD, Lal P, Dondeti VR, Letrero R, Parekh KN, Oquendo CE, Greenberg RA, Flaherty KT, Rathmell WK, Keith B, Simon MC, Nathanson KL (2008) HIF- α Effects on c-Myc Distinguish Two Subtypes of Sporadic VHL-Deficient Clear Cell Renal Carcinoma. *Cancer Cell* 14:435–446
84. Gorr TA, Vogel J (2015) Western blotting revisited: Critical perusal of underappreciated technical issues. *Proteomics – Clin Appl* 9:396–405
85. Gossage L, Eisen T, Maher ER (2015) VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nat Rev Cancer* 15:55–64
86. Gotink KJ, Verheul HMW (2010) Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? *Angiogenesis* 13:1–14

87. Gotink KJ, Broxterman HJ, Labots M, de Haas RR, Dekker H, Honeywell RJ, Rudek MA, Beerepoot LV, Musters RJ, Jansen G, Griffioen AW, Assaraf YG, Pili R, Peters GJ, Verheul HMW (2011) Lysosomal Sequestration of Sunitinib: A Novel Mechanism of Drug Resistance. *Clin Cancer Res* 17:7337–7346
88. Gotink KJ, Rovithi M, de Haas RR, Honeywell RJ, Dekker H, Poel D, Azijli K, Peters GJ, Broxterman HJ, Verheul HMW (2015) Cross-resistance to clinically used tyrosine kinase inhibitors sunitinib, sorafenib and pazopanib. *Cell Oncol Dordr* 38:119–129
89. Greenberg JW, Kim H, Moustafa AA, Datta A, Barata PC, Boulares AH, Abdel-Mageed AB, Krane LS (2021) Repurposing ketoconazole as an exosome directed adjunct to sunitinib in treating renal cell carcinoma. *Sci Rep* 11:10200
90. Gstraunthaler G, Lindl T (2013) *Zell- und Gewebekultur*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
91. Guay C, Regazzi R (2017) Exosomes as new players in metabolic organ cross-talk. *Diabetes Obes Metab* 19:137–146
92. Gulati S, Philip E, Salgia S, Pal SK (2020) Evolving treatment paradigm in metastatic non clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Treat Res Commun* 23:100172
93. Guo C, Liu J, Zhou Q, Song J, Zhang Z, Li Z, Wang G, Yuan W, Sun Z (2020) Exosomal Noncoding RNAs and Tumor Drug Resistance. *Cancer Res* 80:4307–4313
94. Gurunathan S, Kang M-H, Qasim M, Khan K, Kim J-H (2021) Biogenesis, Membrane Trafficking, Functions, and Next Generation Nanotherapeutics Medicine of Extracellular Vesicles. *Int J Nanomedicine* 16:3357–3383
95. Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, Baruteau J (2021) The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal CCS* 19:47
96. Hadla M, Palazzolo S, Corona G, Caligiuri I, Canzonieri V, Toffoli G, Rizzolio F (2016) Exosomes increase the therapeutic index of doxorubicin in breast and ovarian cancer mouse models. *Nanomed* 11:2431–2441
97. Hakimi AA, Chen Y-B, Wren J, Gonen M, Abdel-Wahab O, Heguy A, Liu H, Takeda S, Tickoo SK, Reuter VE, Voss MH, Motzer RJ, Coleman JA, Cheng EH, Russo P, Hsieh JJ (2013) Clinical and Pathologic Impact of Select Chromatin Modulating Tumor Suppressors in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol* 63:848–854
98. Hakulinen J, Sankkila L, Sugiyama N, Lehti K, Keski-Oja J (2008) Secretion of active membrane type 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) into extracellular space in microvesicular exosomes. *J Cell Biochem* 105:1211–1218
99. Hamberg P, Verweij J, Sleijfer S (2010) (Pre-)Clinical Pharmacology and Activity of Pazopanib, a Novel Multikinase Angiogenesis Inhibitor. *The Oncologist* 15:539–547

100. He J, He J, Min L, He Y, Guan H, Wang J, Peng X (2020) Extracellular vesicles transmitted miR-31-5p promotes sorafenib resistance by targeting MLH1 in renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 146:1052–1063
101. Heijnen HFG, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ (1999) Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles: Microvesicles by Surface Shedding and Exosomes Derived From Exocytosis of Multivesicular Bodies and α -Granules. *Blood* 94:3791–3799
102. Hendrix A, Maynard D, Pauwels P, Braems G, Denys H, Van den Broecke R, Lambert J, Van Belle S, Cocquyt V, Gespach C, Bracke M, Seabra MC, Gahl WA, De Wever O, Westbroek W (2010) Effect of the Secretory Small GTPase Rab27B on Breast Cancer Growth, Invasion, and Metastasis. *JNCI J Natl Cancer Inst* 102:866–880
103. Heng DY, Xie W, Regan MM, Warren MA, Golshayan AR, Sahi C, Eigl BJ, Ruether JD, Cheng T, North S, Venner P, Knox JJ, Chi KN, Kollmannsberger C, McDermott DF, Oh WK, Atkins MB, Bukowski RM, Rini BI, Choueiri TK (2009) Prognostic Factors for Overall Survival in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated With Vascular Endothelial Growth Factor–Targeted Agents: Results From a Large, Multicenter Study. *J Clin Oncol* 27:5794–5799
104. Hessvik NP, Llorente A (2018) Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci* 75:193–208
105. Hicklin DJ, Ellis LM (2005) Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. *J Clin Oncol* 23:1011–1027
106. Hisakane K, Seike M, Sugano T, Yoshikawa A, Matsuda K, Takano N, Takahashi S, Noro R, Gemma A (2021) Exosome-derived miR-210 involved in resistance to osimertinib and epithelial–mesenchymal transition in EGFR mutant non-small cell lung cancer cells. *Thorac Cancer* 12:1690–1698
107. Hora M, Hes O, Reischig T, Üрге T, Klečka J, Ferda J, Michal M, Eret V (2008) Tumours in End-Stage Kidney. *Transplant Proc* 40:3354–3358
108. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T-L, Rodrigues G, Hashimoto A, Mark MT, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S, Singh S, Williams C, Soplod N, Uryu K, Pharmed L, King T, Bojmar L, Davies AE, Ararso Y, Zhang T, Zhang H, Hernandez J, Weiss JM, Dumont-Cole VD, Kramer K, Wexler LH, Narendran A, Schwartz GK, Healey JH, Sandstrom P, Labori KJ, Kure EH, Grandgenett PM, Hollingsworth MA, de Sousa M, Kaur S, Jain M, Mallya K, Batra SK, Jarnagin WR, Brady MS, Fodstad O, Muller V, Pantel K, Minn AJ, Bissell MJ, Garcia BA, Kang Y, Rajasekhar VK, Ghajar CM, Matei I, Peinado H, Bromberg J, Lyden D (2015) Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527:329–335

109. Howitt J, Hill AF (2016) Exosomes in the Pathology of Neurodegenerative Diseases. *J Biol Chem* 291:26589–26597
110. Hsieh C-H, Tai S-K, Yang M-H (2018) Snail-overexpressing Cancer Cells Promote M2-Like Polarization of Tumor-Associated Macrophages by Delivering MiR-21-Abundant Exosomes. *Neoplasia N Y N* 20:775–788
111. Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger M, Heng DY, Larkin J, Ficarra V (2017) Renal cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primer* 3:17009
112. Hu Y, Yan C, Mu L, Huang K, Li X, Tao D, Wu Y, Qin J (2015) Fibroblast-Derived Exosomes Contribute to Chemoresistance through Priming Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer. *PLOS ONE* 10:e0125625
113. Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P (2005) Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: Meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer* 114:101–108
114. Hurwitz HI, Dowlati A, Saini S, Savage S, Suttle AB, Gibson DM, Hodge JP, Merkle EM, Pandite L (2009) Phase I Trial of Pazopanib in Patients with Advanced Cancer. *Clin Cancer Res* 15:4220–4227
115. Ifergan I, Scheffer GL, Assaraf YG (2005) Novel Extracellular Vesicles Mediate an ABCG2-Dependent Anticancer Drug Sequestration and Resistance. *Cancer Res* 65:10952–10958
116. Im E-J, Lee C-H, Moon P-G, Rangaswamy GG, Lee B, Lee JM, Lee J-C, Jee J-G, Bae J-S, Kwon T-K, Kang K-W, Jeong M-S, Lee J-E, Jung H-S, Ro H-J, Jun S, Kang W, Seo S-Y, Cho Y-E, Song B-J, Baek M-C (2019) Sulfisoxazole inhibits the secretion of small extracellular vesicles by targeting the endothelin receptor A. *Nat Commun* 10:1387
117. Imai K, Takaoka A (2006) Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer* 6:714–727
118. Imbs D-C, Paludetto M-N, Négrier S, Powell H, Lafont T, White-Koning M, Chatelut E, Thomas F (2016) Determination of unbound fraction of pazopanib in vitro and in cancer patients reveals albumin as the main binding site. *Invest New Drugs* 34:41–48
119. Ishiyama M, Shiga M, Sasamoto K, Mizoguchi M, He P (1993) A New Sulfonated Tetrazolium Salt That Produces a Highly Water-Soluble Formazan Dye. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 41:1118–1122
120. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K (1996) A Combined Assay of Cell Viability and in Vitro Cytotoxicity with a Highly Water-Soluble Tetrazolium Salt, Neutral Red and Crystal Violet. *Biol Pharm Bull* 19:1518–1520
121. Jacobson G, Kårnsäs P (1990) Important parameters in semi-dry electrophoretic transfer. *Electrophoresis* 11:46–52

122. Jadli AS, Parasor A, Gomes KP, Shandilya R, Patel VB (2021) Exosomes in Cardiovascular Diseases: Pathological Potential of Nano-Messenger. *Front Cardiovasc Med* 8:767488
123. Jafari A, Babajani A, Abdollahpour-Alitappeh M, Ahmadi N, Rezaei-Tavirani M (2021) Exosomes and cancer: from molecular mechanisms to clinical applications. *Med Oncol* 38:45
124. Jeyachandran YL, Mielczarski JA, Mielczarski E, Rai B (2010) Efficiency of blocking of non-specific interaction of different proteins by BSA adsorbed on hydrophobic and hydrophilic surfaces. *J Colloid Interface Sci* 341:136–142
125. Jing C, Cao H, Qin X, Yu S, Wu J, Wang Z, Ma R, Feng J (2018) Exosome-mediated gefitinib resistance in lung cancer HCC827 cells via delivery of miR-21. *Oncol Lett* 15:9811–9817
126. Jing X, Xie M, Ding K, Xu T, Fang Y, Ma P, Shu Y (2022) Exosome-transmitted miR-769-5p confers cisplatin resistance and progression in gastric cancer by targeting CASP9 and promoting the ubiquitination degradation of p53. *Clin Transl Med* 12:e780
127. Junker K, Heinzelmann J, Beckham C, Ochiya T, Jenster G (2016) Extracellular Vesicles and Their Role in Urologic Malignancies. *Eur Urol* 70:323–331
128. Kalluri R, LeBleu VS (2020) The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* 367:eaau6977
129. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, Bond VC, Borràs FE, Breakefield X, Budnik V, Buzas E, Camussi G, Clayton A, Cocucci E, Falcon-Perez JM, Gabrielsson S, Ghossein YS, Gupta D, Harsha HC, Hendrix A, Hill AF, Inal JM, Jenster G, Krämer-Albers E-M, Lim SK, Llorente A, Lötvald J, Marcilla A, Mincheva-Nilsson L, Nazarenko I, Nieuwland R, Hoen ENMN-t, Pandey A, Patel T, Piper MG, Pluchino S, Prasad TSK, Rajendran L, Raposo G, Record M, Reid GE, Sánchez-Madrid F, Schiffelers RM, Siljander P, Stensballe A, Stoorvogel W, Taylor D, Thery C, Valadi H, Balkom BWM van, Vázquez J, Vidal M, Wauben MHM, Yáñez-Mó M, Zoeller M, Mathivanan S (2012) Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. *PLOS Biol* 10:e1001450
130. Kamli H, Li L, Gobe GC (2019) Limitations to the Therapeutic Potential of Tyrosine Kinase Inhibitors and Alternative Therapies for Kidney Cancer. *Ochsner J* 19:138–151
131. Kapuscinski J (1995) DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe. *Biotech Histochem* 70:220–233
132. Karakiewicz PI, Briganti A, Chun FK-H, Trinh Q-D, Perrotte P, Ficarra V, Cindolo L, De La Taille A, Tostain J, Mulders PFA, Salomon L, Zigeuner R, Prayer-Galetti T, Chautard D, Valeri A, Lechevallier E, Descotes J-L, Lang H, Mejean A, Patard J-J (2007) Multi-

- Institutional Validation of a New Renal Cancer–Specific Survival Nomogram. *J Clin Oncol* 25:1316–1322
133. Kaufmann SH, Ewing CM, Shaper JH (1987) The erasable Western blot. *Anal Biochem* 161:89–95
 134. Kerbel RS (2008) Tumor Angiogenesis. *N Engl J Med* 358:2039–2049
 135. Kim HK, Kim SY, Lee SJ, Kang M, Kim ST, Jang J, Rath O, Schueler J, Lee DW, Park WY, Kim SJ, Park SH, Lee J (2016) BEZ235 (PIK3/mTOR inhibitor) Overcomes Pazopanib Resistance in Patient-Derived Refractory Soft Tissue Sarcoma Cells. *Transl Oncol* 9:197–202
 136. Kim MS, Haney MJ, Zhao Y, Mahajan V, Deygen I, Klyachko NL, Inskoe E, Piroyan A, Sokolsky M, Okolie O, Hingtgen SD, Kabanov AV, Batrakova EV (2016) Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 12:655–664
 137. Kim WY, Kaelin WG (2004) Role of VHL Gene Mutation in Human Cancer. *J Clin Oncol* 22:4991–5004
 138. King HW, Michael MZ, Gleadle JM (2012) Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer* 12:421
 139. Klatte T, Rossi SH, Stewart GD (2018) Prognostic factors and prognostic models for renal cell carcinoma: a literature review. *World J Urol* 36:1943–1952
 140. Kluszczyńska K, Czernek L, Cypryk W, Pęczek Ł, Döchler M (2020) Methods for the Determination of the Purity of Exosomes. *Curr Pharm Des* 25:4464–4485
 141. Knoechel B, Roderick JE, Williamson KE, Zhu J, Lohr JG, Cotton MJ, Gillespie SM, Fernandez D, Ku M, Wang H, Piccioni F, Silver SJ, Jain M, Pearson D, Kluk MJ, Ott CJ, Shultz LD, Brehm MA, Greiner DL, Gutierrez A, Stegmaier K, Kung AL, Root DE, Bradner JE, Aster JC, Kelliher MA, Bernstein BE (2014) An epigenetic mechanism of resistance to targeted therapy in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 46:364–370
 142. Knudson AG (1971) Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci* 68:820–823
 143. Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV, Laktionov PP (2018) Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *BioMed Res Int* 2018:8545347
 144. Krabbe L-M, Bagrodia A, Margulis V, Wood CG (2014) Surgical Management of Renal Cell Carcinoma. *Semin Interv Radiol* 31:27–32
 145. Krause DS, Van Etten RA (2005) Tyrosine Kinases as Targets for Cancer Therapy. *N Engl J Med* 353:172–187

146. Kuczius T, Hummel M, Böhler O, Humpf H-U (2012) Development and applications of simultaneous immunochemical staining and serial detection of overlapping proteins in blotting procedures. *J Immunol Methods* 386:70–77
147. Kumar R, Knick VB, Rudolph SK, Johnson JH, Crosby RM, Crouthamel M-C, Hopper TM, Miller CG, Harrington LE, Onori JA, Mullin RJ, Gilmer TM, Truesdale AT, Epperly AH, Bolor A, Stafford JA, Luttrell DK, Cheung M (2007) Pharmacokinetic-pharmacodynamic correlation from mouse to human with pazopanib, a multikinase angiogenesis inhibitor with potent antitumor and antiangiogenic activity. *Mol Cancer Ther* 6:2012–2021
148. Lai CP, Kim EY, Badr CE, Weissleder R, Mempel TR, Tannous BA, Breakefield XO (2015) Visualization and tracking of tumour extracellular vesicle delivery and RNA translation using multiplexed reporters. *Nat Commun* 6:7029
149. Lanzi C, Dal Bo L, Favini E, Tortoreto M, Beretta GL, Arrighetti N, Zaffaroni N, Cassinelli G (2019) Overactive IGF1/Insulin Receptors and NRASQ61R Mutation Drive Mechanisms of Resistance to Pazopanib and Define Rational Combination Strategies to Treat Synovial Sarcoma. *Cancers* 11:408
150. Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh F-M, Orcutt ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W, Geil L, Schmidt L, Zhou F, Li H, Wei MH, Chen F, Glenn G, Choyke P, Walther MM, Weng Y, Duan D-SR, Dean M, Glavač D, Richards FM, Crossey PA, Ferguson-Smith MA, Le Paslier D, Chumakov Ilya, Cohen D, Chinault AC, Maher ER, Linehan WM, Zbar B, Lerman MI (1993) Identification of the von Hippel-Lindau Disease Tumor Suppressor Gene. *Science* 260:1317–1320
151. Lehmann BD, Paine MS, Brooks AM, McCubrey JA, Renegar RH, Wang R, Terrian DM (2008) Senescence-Associated Exosome Release from Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Res* 68:7864–7871
152. Lehrich BM, Liang Y, Fiandaca MS (2021) Foetal bovine serum influence on in vitro extracellular vesicle analyses. *J Extracell Vesicles* 10:e1206
153. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 3.0 (2021) AWMF-Registernummer: 043/017OL [Internet]. URL: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/nierenzellkarzinom/> (Zugriff am 13.06.2022)
154. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Adulte Weichgewebesarkome, Langversion 1.1, (2022) AWMF-Registernummer: 032/044OL [Internet]. URL: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/adulte-weichgewebesarkome/> (Zugriff am 22.10.2022)

155. Levi F, Ferlay J, Galeone C, Lucchini F, Negri E, Boyle P, La Vecchia C (2008) The changing pattern of kidney cancer incidence and mortality in Europe. *BJU Int* 101:949–958
156. Lilleby W, Fosså SD (2005) Chemotherapy in metastatic renal cell cancer. *World J Urol* 23:175–179
157. Linares R, Tan S, Gounou C, Arraud N, Brisson AR (2015) High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 4:29509
158. Linehan WM, Vasselli J, Srinivasan R, Walther MM, Merino M, Choyke P, Vocke C, Schmidt L, Isaacs JS, Glenn G, Toro J, Zbar B, Bottaro D, Neckers L (2004) Genetic Basis of Cancer of the Kidney: Disease-Specific Approaches to Therapy. *Clin Cancer Res* 10:6282S-6289S
159. Liu J, Zhu S, Tang W, Huang Q, Mei Y, Yang H (2021) Exosomes from tamoxifen-resistant breast cancer cells transmit drug resistance partly by delivering miR-9-5p. *Cancer Cell Int* 21:55
160. Liu T, Chen G, Sun D, Lei M, Li Y, Zhou C, Li X, Xue W, Wang H, Liu C, Xu J (2017) Exosomes containing miR-21 transfer the characteristic of cisplatin resistance by targeting PTEN and PDCD4 in oral squamous cell carcinoma. *Acta Biochim Biophys Sin* 49:808–816
161. Ljungberg B, Campbell SC, Cho HY, Jacqmin D, Lee JE, Weikert S, Kiemeny LA (2011) The Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol* 60:615–621
162. Ljungberg B, Sundqvist P, Lindblad P, Kjellman A, Thorstenson A, Hellström M, Kröger Dahlin B-I, Thomasson M, Harmenberg U, Lundstam S (2020) Survival advantage of upfront cytoreductive nephrectomy in patients with primary metastatic renal cell carcinoma compared with systemic and palliative treatments in a real-world setting. *Scand J Urol* 54:487–492
163. Lobb RJ, van Amerongen R, Wiegmans A, Ham S, Larsen JE, Möller A (2017) Exosomes derived from mesenchymal non-small cell lung cancer cells promote chemoresistance. *Int J Cancer* 141:614–620
164. Logozzi M, Milito AD, Lugini L, Borghi M, Calabrò L, Spada M, Perdicchio M, Marino ML, Federici C, Iessi E, Brambilla D, Venturi G, Lozupone F, Santinami M, Huber V, Maio M, Rivoltini L, Fais S (2009) High Levels of Exosomes Expressing CD63 and Caveolin-1 in Plasma of Melanoma Patients. *PLOS ONE* 4:e5219
165. Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, Gho YS, Kurochkin IV, Mathivanan S, Quesenberry P, Sahoo S, Tahara H, Wauben MH, Witwer KW, Théry C (2014) Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles* 3:26913

166. Lv M, Zhu X, Chen W, Zhong S, Hu Q, Ma T, Zhang J, Chen L, Tang J, Zhao J (2014) Exosomes mediate drug resistance transfer in MCF-7 breast cancer cells and a probable mechanism is delivery of P-glycoprotein. *Tumor Biol* 35:10773–10779
167. Ma Y, Yuwen D, Chen J, Zheng B, Gao J, Fan M, Xue W, Wang Y, Li W, Shu Y, Xu Q, Shen Y (2019) Exosomal Transfer Of Cisplatin-Induced miR-425-3p Confers Cisplatin Resistance In NSCLC Through Activating Autophagy. *Int J Nanomedicine* 14:8121–8132
168. Maacha S, Bhat AA, Jimenez L, Raza A, Haris M, Uddin S, Grivel J-C (2019) Extracellular vesicles-mediated intercellular communication: roles in the tumor microenvironment and anti-cancer drug resistance. *Mol Cancer* 18:55
169. Macleod LC, Hotaling JM, Wright JL, Davenport MT, Gore JL, Harper J, White E (2013) Risk Factors for Renal Cell Carcinoma in the Vitamin and Lifestyle (VITAL) Study. *J Urol* 190:1657–1661
170. Maher ER, Neumann HP, Richard S (2011) von Hippel–Lindau disease: A clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet* 19:617–623
171. Maher ER (2018) Hereditary renal cell carcinoma syndromes: diagnosis, surveillance and management. *World J Urol* 36:1891–1898
172. Maisonneuve P, Agodoa L, Gellert R, Stewart JH, Bucciante G, Lowenfels AB, Wolf RA, Jones E, Dsiney AP, Briggs D, McCredie M, Boyle P (1999) Cancer in patients on dialysis for end-stage renal disease: an international collaborative study. *The Lancet* 354:93–99
173. Majo S, Courtois S, Souleyreau W, Bikfalvi A, Auguste P (2020) Impact of Extracellular Matrix Components to Renal Cell Carcinoma Behavior. *Front Oncol* 10:625
174. Makhov P, Joshi S, Ghatalia P, Kutikov A, Uzzo RG, Kolenko VM (2018) Resistance to Systemic Therapies in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Mechanisms and Management Strategies. *Mol Cancer Ther* 17:1355–1364
175. Mao L, Li J, Chen W, Cai Y, Yu D, Zhong S, Zhao J, Zhou J, Tang J (2016) Exosomes decrease sensitivity of breast cancer cells to adriamycin by delivering microRNAs. *Tumor Biol* 37:5247–5256
176. Marple T, Chonko M (1994) Renal Cancer Complicating Acquired Disease. *J Am Soc Nephrol* 4:1951–1956
177. Mashouri L, Yousefi H, Aref AR, Ahadi A mohammad, Molaei F, Alahari SK (2019) Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Mol Cancer* 18:75
178. Mattei J, da Silva RD, Sehr D, Molina WR, Kim FJ (2014) Targeted therapy in metastatic renal carcinoma. *Cancer Lett* 343:156–160
179. McCready J, Sims JD, Chan D, Jay DG (2010) Secretion of extracellular hsp90 α via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. *BMC Cancer* 10:294

180. MedChemExpress (o. J.) Product Data Sheet: Pazopanib Hydrochloride [Internet]. URL: https://file.medchemexpress.com/batch_PDF/HY-12009/Pazopanib-Hydrochloride-DataSheet-MedChemExpress.pdf (Zugriff am 14.10.2022)
181. Menko FH, Maher ER (2016) Diagnosis and Management of Hereditary Renal Cell Cancer. In: Pichert G, Jacobs C (eds) Rare Hereditary Cancers. Recent Results in Cancer Research. Springer International Publishing, Cham, pp 85-104
182. Mikamori M, Yamada D, Eguchi H, Hasegawa S, Kishimoto T, Tomimaru Y, Asaoka T, Noda T, Wada H, Kawamoto K, Gotoh K, Takeda Y, Tanemura M, Mori M, Doki Y (2017) MicroRNA-155 Controls Exosome Synthesis and Promotes Gemcitabine Resistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Sci Rep* 7:42339
183. Minciacchi VR, Freeman MR, Di Vizio D (2015) Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. *Semin Cell Dev Biol* 40:41–51
184. Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, González S, Sánchez-Cabo F, González MÁ, Bernad A, Sánchez-Madrid F (2011) Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* 2:282
185. Miyake M, Anai S, Fujimoto K, Ohnishi S, Kuwada M, Nakai Y, Inoue T, Tomioka A, Tanaka N, Hirao Y (2012) 5-fluorouracil enhances the antitumor effect of sorafenib and sunitinib in a xenograft model of human renal cell carcinoma. *Oncol Lett* 3:1195–1202
186. Moch H (2016) WHO-ISUP-Graduierungssystem für Nierenkarzinome. *Pathol* 37:355–360
187. Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE (eds) (2016) WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs. 4. edition. International agency for research on cancer, Lyon
188. Moch H, Amin MB, Berney DM, Compérat EM, Gill AJ, Hartmann A, Menon S, Raspollini MR, Rubin MA, Srigley JR, Hoon Tan P, Tickoo SK, Tsuzuki T, Turajlic S, Cree I, Netto GJ (2022) The 2022 World Health Organization Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol* 82:458–468
189. Mol EA, Goumans M-J, Doevendans PA, Sluijter JPG, Vader P (2017) Higher functionality of extracellular vesicles isolated using size-exclusion chromatography compared to ultracentrifugation. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 13:2061–2065
190. Molla Kazemiha V, Amanzadeh A, Memarnejadian A, Azari S, Shokrgozar MA, Mahdian R, Bonakdar S (2014) Sensitivity of biochemical test in comparison with other methods for the detection of mycoplasma contamination in human and animal cell lines stored in the National Cell Bank of Iran. *Cytotechnology* 66:861–873

191. Möller A, Lobb RJ (2020) The evolving translational potential of small extracellular vesicles in cancer. *Nat Rev Cancer* 20:697–709
192. Morshid A, Duran ES, Choi WJ, Duran C (2021) A Concise Review of the Multimodality Imaging Features of Renal Cell Carcinoma. *Cureus* 13:e13231
193. Mostafazadeh M, Kahroba H, Haiaty S, TazeKand AP, Samadi N, Rahbarghazi R, Nouri M (2022) In vitro exosomal transfer of Nrf2 led to the oxaliplatin resistance in human colorectal cancer LS174T cells. *Cell Biochem Funct* 40:391–402
194. Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM (1996) Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 335:865–875
195. Motzer RJ, Russo P (2000) Systemic Therapy for Renal Cell Carcinoma. *J Urol* 163:408–417
196. Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, Russo P, Mazumdar M (2002) Interferon-Alfa as a Comparative Treatment for Clinical Trials of New Therapies Against Advanced Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 20:289–296
197. Motzer RJ, Hutson TE, Cella D, Reeves J, Hawkins R, Guo J, Nathan P, Staehler M, de Souza P, Merchan JR, Boleti E, Fife K, Jin J, Jones R, Uemura H, De Giorgi U, Harmenberg U, Wang J, Sternberg CN, Deen K, McCann L, Hackshaw MD, Crescenzo R, Pandite LN, Choueiri TK (2013) Pazopanib versus Sunitinib in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 369:722–731
198. Nakamura N, Rabouille C, Watson R, Nilsson T, Hui N, Slusarewicz P, Kreis TE, Warren G (1995) Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J Cell Biol* 131:1715–1726
199. Nazarenko I, Rana S, Baumann A, McAlear J, Hellwig A, Trendelenburg M, Lochnit G, Preissner KT, Zöller M (2010) Cell Surface Tetraspanin Tspan8 Contributes to Molecular Pathways of Exosome-Induced Endothelial Cell Activation. *Cancer Res* 70:1668–1678
200. Nie Y, Sato Y, Garner RT, Kargl C, Wang C, Kuang S, Gilpin CJ, Gavin TP (2019) Skeletal muscle-derived exosomes regulate endothelial cell functions via reactive oxygen species-activated nuclear factor- κ B signalling. *Exp Physiol* 104:1262–1273
201. Ntellas P, Mavroeidis L, Gkoura S, Gazouli I, Amylidi A-L, Papadaki A, Zarkavelis G, Mauri D, Karpathiou G, Kolettas E, Batistatou A, Pentheroudakis G (2020) Old Player-New Tricks: Non Angiogenic Effects of the VEGF/VEGFR Pathway in Cancer. *Cancers* 12:3145
202. Padala SA, Barsouk A, Thandra KC, Saginala K, Mohammed A, Vakiti A, Rawla P, Barsouk A (2020) Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *World J Oncol* 11:79–87
203. Pantuck AJ, Zisman A, Rauch MK, Belldegrun A (2000) Incidental renal tumors. *Urology* 56:190–196
204. Patard J-J (2009) Incidental renal tumours. *Curr Opin Urol* 19:454–458

205. Pawson T (2002) Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur J Cancer* 38:S3–S10
206. Petejova N, Martinek A (2016) Renal cell carcinoma: Review of etiology, pathophysiology and risk factors. *Biomed Pap* 160:183–194
207. Piccinini F, Tesei A, Arienti C, Bevilacqua A (2017) Cell Counting and Viability Assessment of 2D and 3D Cell Cultures: Expected Reliability of the Trypan Blue Assay. *Biol Proced Online* 19:8
208. Poggio M, Hu T, Pai C-C, Chu B, Belair CD, Chang A, Montabana E, Lang UE, Fu Q, Fong L, Blleloch R (2019) Suppression of Exosomal PD-L1 Induces Systemic Anti-tumor Immunity and Memory. *Cell* 177:414–427
209. Pol E van der, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R (2012) Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. *Pharmacol Rev* 64:676–705
210. Pollard TD, Cooper JA (2009) Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement. *Science* 326:1208–1212
211. Prager EM, Chambers KE, Plotkin JL, McArthur DL, Bandrowski AE, Bansal N, Martone ME, Bergstrom HC, Bernalov A, Graf C (2019) Improving transparency and scientific rigor in academic publishing. *J Neurosci Res* 97:377–390
212. Pužar Dominkuš P, Stenovec M, Sitar S, Lasič E, Zorec R, Plemenitaš A, Žagar E, Kreft M, Lenassi M (2018) PKH26 labeling of extracellular vesicles: Characterization and cellular internalization of contaminating PKH26 nanoparticles. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 1860:1350–1361
213. Pužar Dominkuš P, Stenovec M, Sitar S, Lasič E, Zorec R, Plemenitaš A, Žagar E, Kreft M, Lenassi M (2018) PKH26 labeling of extracellular vesicles: Characterization and cellular internalization of contaminating PKH26 nanoparticles. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 1860:1350–1361
214. Qin X, Yu S, Zhou L, Shi M, Hu Y, Xu X, Shen B, Liu S, Yan D, Feng J (2017) Cisplatin-resistant lung cancer cell-derived exosomes increase cisplatin resistance of recipient cells in exosomal miR-100-5p-dependent manner. *Int J Nanomedicine* 12:3721–3733
215. Qu L, Ding J, Chen C, Wu Z-J, Liu B, Gao Y, Chen W, Liu F, Sun W, Li X-F, Wang X, Wang Y, Xu Z-Y, Gao L, Yang Q, Xu B, Li Y-M, Fang Z-Y, Xu Z-P, Bao Y, Wu D-S, Miao X, Sun H-Y, Sun Y-H, Wang H-Y, Wang L-H (2016) Exosome-Transmitted IncARSR Promotes Sunitinib Resistance in Renal Cancer by Acting as a Competing Endogenous RNA. *Cancer Cell* 29:653–668
216. Qu Z, Wu J, Wu J, Luo D, Jiang C, Ding Y (2016) Exosomes derived from HCC cells induce sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma both in vivo and in vitro. *J Exp Clin Cancer Res* 35:159

217. Rabinowits G, Gerçel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH (2009) Exosomal MicroRNA: A Diagnostic Marker for Lung Cancer. *Clin Lung Cancer* 10:42–46
218. Raimondo S, Saieva L, Corrado C, Fontana S, Flugy A, Rizzo A, De Leo G, Alessandro R (2015) Chronic myeloid leukemia-derived exosomes promote tumor growth through an autocrine mechanism. *Cell Commun Signal CCS* 13:8
219. Ramp U, Dejosez M, Mahotka C, Czarnotta B, Kalinski T, Wenzel M, Lorenz I, Müller M, Krammer P, Gabbert HE, Gerharz CD (2000) Deficient activation of CD95 (APO-1/ Fas)-mediated apoptosis: a potential factor of multidrug resistance in human renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 82:1851–1859
220. Ramteke A, Ting H, Agarwal C, Mateen S, Somasagara R, Hussain A, Graner M, Frederick B, Agarwal R, Deep G (2015) Exosomes secreted under hypoxia enhance invasiveness and stemness of prostate cancer cells by targeting adherens junction molecules. *Mol Carcinog* 54:554–565
221. Raposo G, Stoorvogel W (2013) Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200:373–383
222. Rehm H, Letzel T (2016) *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
223. Reinard T (2021) *Molekularbiologische Methoden 2.0. 3., aktualisierte Auflage edition*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
224. Relf M, LeJeune S, Scott PAE, Fox S, Smith K, Leek R, Moghaddam A, Whitehouse R, Bicknell R, Harris AL (1997) Expression of the Angiogenic Factors Vascular Endothelial Cell Growth Factor, Acidic and Basic Fibroblast Growth Factor, Tumor Growth Factor β -1, Platelet-derived Endothelial Cell Growth Factor, Placenta Growth Factor, and Pleiotrophin in Human Primary Breast Cancer and Its Relation to Angiogenesis. *Cancer Res* 57:963–969
225. Richards KE, Zeleniak AE, Fishel ML, Wu J, Littlepage LE, Hill R (2017) Cancer-associated fibroblast exosomes regulate survival and proliferation of pancreatic cancer cells. *Oncogene* 36:1770–1778
226. Rider MA, Hurwitz SN, Meckes DG (2016) ExtraPEG: A Polyethylene Glycol-Based Method for Enrichment of Extracellular Vesicles. *Sci Rep* 6:23978
227. Ridge CA, Pua BB, Madoff DC (2014) Epidemiology and Staging of Renal Cell Carcinoma. *Semin Interv Radiol* 31:3–8
228. Rini BI, Campbell SC, Escudier B (2009) Renal cell carcinoma. *The Lancet* 373:1119–1132
229. Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (eds) (2021) *Krebs in Deutschland für 2017/2018*. Berlin

230. Saari H, Lázaro-Ibáñez E, Viitala T, Vuorimaa-Laukkanen E, Siljander P, Yliperttula M (2015) Microvesicle- and exosome-mediated drug delivery enhances the cytotoxicity of Paclitaxel in autologous prostate cancer cells. *J Controlled Release* 220:727–737
231. Sacco E, Pinto F, Sasso F, Racioppi M, Gulino G, Volpe A, Bassi P (2009) Paraneoplastic Syndromes in Patients with Urological Malignancies. *Urol Int* 83:1–11
232. Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, Maekawa S, Okuno Y, Kamura T, Shimamura T, Sato-Otsubo A, Nagae G, Suzuki H, Nagata Y, Yoshida K, Kon A, Suzuki Y, Chiba K, Tanaka H, Niida A, Fujimoto A, Tsunoda T, Morikawa T, Maeda D, Kume H, Sugano S, Fukayama M, Aburatani H, Sanada M, Miyano S, Homma Y, Ogawa S (2013) Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nat Genet* 45:860–867
233. Sawhney R, Kabbinavar F (2008) Angiogenesis and angiogenic inhibitors in renal cell carcinoma. *Curr Urol Rep* 9:26–33
234. Schieda N, Davenport MS, Krishna S, Edney EA, Pedrosa I, Hindman N, Baroni RH, Curci NE, Shinagare A, Silverman SG (2021) Bosniak Classification of Cystic Renal Masses, Version 2019: A Pictorial Guide to Clinical Use. *RadioGraphics* 41:814–828
235. Schlessinger J (2000) Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 103:211–225
236. Schmitz S (2011) *Der Experimentator: Zellkultur*. 3. edition. Spektrum, Akad. Verl, Heidelberg
237. Selleckchem (o. J.) Product Data Sheet Pazopanib HCl (GW786034 HCl) [Internet]. URL: <https://www.selleckchem.com/datasheet/Pazopanib-Hydrochloride-S103513-DataSheet.html> (Zugriff am 14.10.2022)
238. Sento S, Sasabe E, Yamamoto T (2016) Application of a Persistent Heparin Treatment Inhibits the Malignant Potential of Oral Squamous Carcinoma Cells Induced by Tumor Cell-Derived Exosomes. *PLOS ONE* 11:e0148454
239. Shah K, Rawal RM (2019) Genetic and Epigenetic Modulation of Drug Resistance in Cancer: Challenges and Opportunities. *Curr Drug Metab* 20:1114–1131
240. Shang Y, Cai X, Fan D (2013) Roles of Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer Drug Resistance. *Curr Cancer Drug Targets* 13:915–929
241. Shapiro JA, Williams MA, Weiss NS, Stergachis A, LaCroix AZ, Barlow WE (1999) Hypertension, Antihypertensive Medication Use, and Risk of Renal Cell Carcinoma. *Am J Epidemiol* 149:521–530
242. Sharma P, Diergaarde B, Ferrone S, Kirkwood JM, Whiteside TL (2020) Melanoma cell-derived exosomes in plasma of melanoma patients suppress functions of immune effector cells. *Sci Rep* 10:92

243. Sharma R, Kadife E, Myers M, Kannourakis G, Prithviraj P, Ahmed N (2021) Determinants of resistance to VEGF-TKI and immune checkpoint inhibitors in metastatic renal cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 40:186
244. Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, McDermott U, Azizian N, Zou L, Fischbach MA, Wong K-K, Brandstetter K, Wittner B, Ramaswamy S, Classon M, Settleman J (2010) A chromatin-mediated reversible drug tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* 141:69–80
245. Shedden K, Xie XT, Chandaroy P, Chang YT, Rosania GR (2003) Expulsion of Small Molecules in Vesicles Shed by Cancer Cells: Association with Gene Expression and Chemosensitivity Profiles. *Cancer Res* 63:4331–4337
246. Sheldon H, Heikamp E, Turley H, Dragovic R, Thomas P, Oon CE, Leek R, Edelmann M, Kessler B, Sainson RCA, Sargent I, Li J-L, Harris AL (2010) New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by Delta-like 4 incorporation into exosomes. *Blood* 116:2385–2394
247. Shelke GV, Lässer C, Gho YS, Lötvall J (2014) Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *J Extracell Vesicles* 3:24783
248. Shen C, Kaelin WG (2013) The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma. *Semin Cancer Biol* 23:18–25
249. Shen Y, Guo D, Weng L, Wang S, Ma Z, Yang Y, Wang P, Wang J, Cai Z (2017) Tumor-derived exosomes educate dendritic cells to promote tumor metastasis via HSP72/HSP105-TLR2/TLR4 pathway. *Oncolmmunology* 6:e1362527
250. Shiozawa K, Shuting J, Yoshioka Y, Ochiya T, Kondo T (2018) Extracellular vesicle-encapsulated microRNA-761 enhances pazopanib resistance in synovial sarcoma. *Biochem Biophys Res Commun* 495:1322–1327
251. Shojaei F, Wu X, Malik AK, Zhong C, Baldwin ME, Schanz S, Fuh G, Gerber H-P, Ferrara N (2007) Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells. *Nat Biotechnol* 25:911–920
252. Shuch B, Amin A, Armstrong AJ, Eble JN, Ficarra V, Lopez-Beltran A, Martignoni G, Rini BI, Kutikov A (2015) Understanding Pathologic Variants of Renal Cell Carcinoma: Distilling Therapeutic Opportunities from Biologic Complexity. *Eur Urol* 67:85–97
253. Singh A, Settleman J (2010) EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29:4741–4751
254. Sisquella X, Ofir-Birin Y, Pimentel MA, Cheng L, Abou Karam P, Sampaio NG, Penington JS, Connolly D, Giladi T, Scicluna BJ, Sharples RA, Waltmann A, Avni D, Schwartz E, Schofield L, Porat Z, Hansen DS, Papenfuss AT, Eriksson EM, Gerlic M, Hill AF, Bowie

- AG, Regev-Rudzki N (2017) Malaria parasite DNA-harboring vesicles activate cytosolic immune sensors. *Nat Commun* 8:1985
255. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76–85
256. Sousa D, Lima RT, Vasconcelos MH (2015) Intercellular Transfer of Cancer Drug Resistance Traits by Extracellular Vesicles. *Trends Mol Med* 21:595–608
257. Srinivasan R, Ricketts CJ, Sourbier C, Linehan WM (2015) New Strategies in Renal Cell Carcinoma: Targeting the Genetic and Metabolic Basis of Disease. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 21:10–17
258. Stamati K, Redondo PA, Nyga A, Neves JB, Tran MG, Emberton M, Cheema U, Loizidou M (2020) The anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitor Pazopanib kills cancer cells and disrupts endothelial networks in biomimetic three-dimensional renal tumouroids. *J Tissue Eng* 11:2041731420920597
259. Steinbichler TB, Dudás J, Skvortsov S, Ganswindt U, Riechelmann H, Skvortsova I-I (2019) Therapy resistance mediated by exosomes. *Mol Cancer* 18:58
260. Sternberg CN, Davis ID, Mardiak J, Szczylik C, Lee E, Wagstaff J, Barrios CH, Salman P, Gladkov OA, Kavina A, Zarbá JJ, Chen M, McCann L, Pandite L, Roychowdhury DF, Hawkins RE (2010) Pazopanib in Locally Advanced or Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase III Trial. *J Clin Oncol* 28:1061–1068
261. Suárez C, Campayo M, Bastús R, Castillo S, Etxanitz O, Guix M, Sala N, Gallardo E (2018) Prognostic and Predictive Factors for Renal Cell Carcinoma. *Target Oncol* 13:309–331
262. Sun D, Zhuang X, Xiang X, Liu Y, Zhang S, Liu C, Barnes S, Grizzle W, Miller D, Zhang H-G (2010) A Novel Nanoparticle Drug Delivery System: The Anti-inflammatory Activity of Curcumin Is Enhanced When Encapsulated in Exosomes. *Mol Ther* 18:1606–1614
263. Sun M, Thuret R, Abdollah F, Lughezzani G, Schmitges J, Tian Z, Shariat SF, Montorsi F, Patard J-J, Perrotte P, Karakiewicz PI (2011) Age-Adjusted Incidence, Mortality, and Survival Rates of Stage-Specific Renal Cell Carcinoma in North America: A Trend Analysis. *Eur Urol* 59:135–141
264. Sun M-Y, Xu B, Wu Q-X, Chen W-L, Cai S, Zhang H, Tang Q-F (2021) Cisplatin-Resistant Gastric Cancer Cells Promote the Chemoresistance of Cisplatin-Sensitive Cells via the Exosomal RPS3-Mediated PI3K-Akt-Cofilin-1 Signaling Axis. *Front Cell Dev Biol* 9:618899
265. Suttle AB, Ball HA, Molimard M, Hutson TE, Carpenter C, Rajagopalan D, Lin Y, Swann S, Amado R, Pandite L (2014) Relationships between pazopanib exposure and clinical

- safety and efficacy in patients with advanced renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 111:1909–1916
266. Syn N, Wang L, Sethi G, Thiery J-P, Goh B-C (2016) Exosome-Mediated Metastasis: From Epithelial–Mesenchymal Transition to Escape from Immunosurveillance. *Trends Pharmacol Sci* 37:606–617
 267. Takahashi A, Okada R, Nagao K, Kawamata Y, Hanyu A, Yoshimoto S, Takasugi M, Watanabe S, Kanemaki MT, Obuse C, Hara E (2017) Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat Commun* 8:15287
 268. Takov K, Yellon DM, Davidson SM (2017) Confounding factors in vesicle uptake studies using fluorescent lipophilic membrane dyes. *J Extracell Vesicles* 6:1388731
 269. Tan AR, Gibbon DG, Stein MN, Lindquist D, Edenfield JW, Martin JC, Gregory C, Suttle AB, Tada H, Botbyl J, Stephenson JJ (2013) Effects of ketoconazole and esomeprazole on the pharmacokinetics of pazopanib in patients with solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 71:1635–1643
 270. Tang MKS, Yue PYK, Ip PP, Huang R-L, Lai H-C, Cheung ANY, Tse KY, Ngan HYS, Wong AST (2018) Soluble E-cadherin promotes tumor angiogenesis and localizes to exosome surface. *Nat Commun* 9:2270
 271. Tang Z, He J, Zou J, Yu S, Sun X, Qin L (2021) Cisplatin-resistant HepG2 cell-derived exosomes transfer cisplatin resistance to cisplatin-sensitive cells in HCC. *PeerJ* 9:e11200
 272. Tauro BJ, Mathias RA, Greening DW, Gopal SK, Ji H, Kapp EA, Coleman BM, Hill AF, Kusebauch U, Hallows JL, Shteynberg D, Moritz RL, Zhu H-J, Simpson RJ (2013) Oncogenic H-Ras Reprograms Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Cell-derived Exosomal Proteins Following Epithelial-Mesenchymal Transition. *Mol Cell Proteomics MCP* 12:2148–2159
 273. Theis RP, Dolwick Grieb SM, Burr D, Siddiqui T, Asal NR (2008) Smoking, environmental tobacco smoke, and risk of renal cell cancer: a population-based case-control study. *BMC Cancer* 8:387
 274. Thermo Fisher Scientific Inc. (2021) User Guide: Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate (Pub. No. MAN0011810) [Internet]. URL: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0011810_Pierce_ECL_Plus_West_Blotting_Sub_s_UG.pdf (Zugriff am 29.10.2022)
 275. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A (2006) Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 30:3.22.1-3.22.29

276. Torreggiani E, Roncuzzi L, Perut F, Zini N, Baldini N (2016) Multimodal transfer of MDR by exosomes in human osteosarcoma. *Int J Oncol* 49:189–196
277. Toth AT, Cho DC (2020) Emerging Therapies for Advanced Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Kidney Cancer VHL* 7:17–26
278. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brügger B, Simons M (2008) Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science* 319:1244–1247
279. Trpkov K, Grignon DJ, Bonsib SM, Amin MB, Billis A, Lopez-Beltran A, Samaratunga H, Tamboli P, Delahunt B, Egevad L, Montironi R, Srigley JR, the members of the ISUP Renal Tumor Panel (2013) Handling and Staging of Renal Cell Carcinoma: The International Society of Urological Pathology Consensus (ISUP) Conference Recommendations. *Am J Surg Pathol* 37:1505–1517
280. Tumorregister München Überleben ICD-10 C64: Nierenkarzinom [Internet]. (2022). URL: https://www.tumorregister-muenchen.de/facts/surv/sC64__G-ICD-10-C64-Nierenkarzinom-Survival.pdf (Zugriff am 17.06.2022)
281. Tyner JW, Haderk F, Kumaraswamy A, Baughn LB, Van Ness B, Liu S, Marathe H, Alumkal JJ, Bivona TG, Chan KS, Druker BJ, Hutson AD, Nelson PS, Sawyers CL, Willey CD (2022) Understanding Drug Sensitivity and Tackling Resistance in Cancer. *Cancer Res* 82:1448–1460
282. US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (2008) Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review Pazopanib (NDA 22-465) [Internet]. URL: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2009/022465s000_ClinPharmR.pdf (Zugriff am 14.10.2022)
283. Van Deun J, Mestdagh P, Agostinis P, Akay Ö, Anand S, Anckaert J, Martinez ZA, Baetens T, Beghein E, Bertier L, Berx G, Boere J, Boukouris S, Bremer M, Buschmann D, Byrd JB, Casert C, Cheng L, Cmoch A, Daveloose D, De Smedt E, Demirsoy S, Depoorter V, Dhondt B, Driedonks TAP, Dudek A, Elsharawy A, Floris I, Foers AD, Gärtner K, Garg AD, Geeurickx E, Gettemans J, Ghazavi F, Giebel B, Kormelink TG, Hancock G, Helmsmoortel H, Hill AF, Hyenne V, Kalra H, Kim D, Kowal J, Kraemer S, Leidinger P, Leonelli C, Liang Y, Lippens L, Liu S, Lo Cicero A, Martin S, Mathivanan S, Mathiyalagan P, Matusek T, Milani G, Monguió-Tortajada M, Mus LM, Muth DC, Németh A, Nolte-t Hoen ENM, O’Driscoll L, Palmulli R, Pfaffl MW, Primdal-Bengtson B, Romano E, Rousseau Q, Sahoo S, Sampaio N, Samuel M, Scicluna B, Soen B, Steels A, Swinnen JV, Takatalo M, Thaminy S, Théry C, Tulkens J, Van Audenhove I, van der Grein S, Van Goethem A, van Herwijnen MJ, Van Niel G, Van Roy N, Van Vliet AR, Vandamme N, Vanhauwaert S, Vergauwen G, Verweij F, Wallaert A, Wauben M, Witwer KW,

- Zonneveld MI, De Wever O, Vandesompele J, Hendrix A (2017) EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nat Methods* 14:228–232
284. van Niel G, Charrin S, Simoes S, Romao M, Rochin L, Saftig P, Marks MS, Rubinstein E, Raposo G (2011) The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell* 21:708–721
285. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G (2018) Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:213–228
286. Vector Laboratories (2022) User Guide: VECTASHIELD HardSet Antifade Mounting Medium with DAPI [Internet]. URL: https://vectorlabs.com/media/folio3/productattachments/protocol/VL_H-1500_UserGuide_LBL02355.pdf (Zugriff am 04.02.2023)
287. Vella LJ, Behren A, Coleman B, Greening DW, Hill AF, Cebon J (2017) Intercellular Resistance to BRAF Inhibition Can Be Mediated by Extracellular Vesicle–Associated PDGFR β . *Neoplasia* 19:932–940
288. Verheijen RB, Swart LE, Beijnen JH, Schellens JHM, Huitema ADR, Steeghs N (2017) Exposure-survival analyses of pazopanib in renal cell carcinoma and soft tissue sarcoma patients: opportunities for dose optimization. *Cancer Chemother Pharmacol* 80:1171–1178
289. Vesiclepedia (o.J.) Vesiclepedia: Extracellular vesicle Markers- Top 100 EV Proteins [Internet]. URL: http://microvesicles.org/extracellular_vesicle_markers (Zugriff am 02.11.22)
290. Volpe A, Jewett MA (2007) The role of surveillance for small renal masses. *Nat Clin Pract Urol* 4:2–3
291. Volpe A, Patard JJ (2010) Prognostic factors in renal cell carcinoma. *World J Urol* 28:319–327
292. Volpe A, Finelli A, Gill IS, Jewett MAS, Martignoni G, Polascik TJ, Remzi M, Uzzo RG (2012) Rationale for Percutaneous Biopsy and Histologic Characterisation of Renal Tumours. *Eur Urol* 62:491–504
293. Vynnytska-Myronovska B, Heinzelmann J, Hölter S, Stoeckle M, Junker K (2018) Characterization of pazopanib resistance in renal cell carcinoma cell lines [abstract]. In: Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2018; 2018 Apr 14–18; Chicago, IL. *Cancer Res* 78:Abstract nr 2840
294. Wajapeyee N, Gupta R (2021) Epigenetic alterations and mechanisms that drive resistance to targeted cancer therapies. *Cancer Res* 81:5589–5595

295. Wallace PK, Tario Jr. JD, Fisher JL, Wallace SS, Ernstoff MS, Muirhead KA (2008) Tracking antigen-driven responses by flow cytometry: Monitoring proliferation by dye dilution. *Cytometry A* 73A:1019–1034
296. Wang C, Wang Y, Hong T, Cheng B, Gan S, Chen L, Zhang J, Zuo L, Li J, Cui X (2020) Blocking the autocrine regulatory loop of Gankyrin/STAT3/CCL24/CCR3 impairs the progression and pazopanib resistance of clear cell renal cell carcinoma. *Cell Death Dis* 11:117
297. Wang M, Qiu R, Yu S, Xu X, Li G, Gu R, Tan C, Zhu W, Shen B (2018) Paclitaxel-resistant gastric cancer MGC-803 cells promote epithelial-to-mesenchymal transition and chemoresistance in paclitaxel-sensitive cells via exosomal delivery of miR-155-5p. *Int J Oncol* 54:326–338
298. Wang X, Luo G, Zhang K, Cao J, Huang C, Jiang T, Liu B, Su L, Qiu Z (2018) Hypoxic Tumor-Derived Exosomal miR-301a Mediates M2 Macrophage Polarization via PTEN/PI3K γ to Promote Pancreatic Cancer Metastasis. *Cancer Res* 78:4586–4598
299. Warren AY, Harrison D (2018) WHO/ISUP classification, grading and pathological staging of renal cell carcinoma: standards and controversies. *World J Urol* 36:1913–1926
300. Wei Y, Lai X, Yu S, Chen S, Ma Y, Zhang Y, Li H, Zhu X, Yao L, Zhang J (2014) Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 147:423–431
301. Weikert S, Boeing H, Pischon T, Weikert C, Olsen A, Tjonneland A, Overvad K, Becker N, Linseisen J, Trichopoulou A, Mountokalakis T, Trichopoulos D, Sieri S, Palli D, Vineis P, Panico S, Peeters PHM, Bueno-de-Mesquita HB, Verschuren WMM, Ljungberg B, Hallmans G, Berglund G, González CA, Dorronsoro M, Barricarte A, Tormo MJ, Allen N, Roddam A, Bingham S, Khaw K-T, Rinaldi S, Ferrari P, Norat T, Riboli E (2008) Blood Pressure and Risk of Renal Cell Carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Epidemiol* 167:438–446
302. Whaley D, Damyar K, Witek RP, Mendoza A, Alexander M, Lakey JR (2021) Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplant* 30:0963689721999617
303. Whiteside TL (2016) Tumor-derived exosomes and their role in cancer progression. *Adv Clin Chem* 74:103–141
304. WHO (2022) Classification of tumours of the urinary system and male genital organs. 5th edition. International Agency for Research on Cancer, Lyon
305. Wiechelmann KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* 175:231–237

306. Wilding JL, Bodmer WF (2014) Cancer Cell Lines for Drug Discovery and Development. *Cancer Res* 74:2377–2384
307. Wittekind C, International Union against Cancer (eds) (2020) TNM - Klassifikation maligner Tumoren. 8. Auflage, korrigierter Nachdruck 2020 mit allen Ergänzungen der UICC aus den Jahren 2017 bis 2019 edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
308. Wood LS (2009) Renal Cell Carcinoma: Screening, Diagnosis, and Prognosis. *Clin J Oncol Nurs* 13:3–7
309. Wulf E, Deboben A, Bautz FA, Faulstich H, Wieland T (1979) Fluorescent phalloxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proc Natl Acad Sci* 76:4498–4502
310. Xavier CPR, Pesic M, Vasconcelos MH (2016) Understanding Cancer Drug Resistance by Developing and Studying Resistant Cell Line Models. *Curr Cancer Drug Targets* 16:226–237
311. Xu X, Zhu Y, Zheng X, Xie L (2015) Does beer, wine or liquor consumption correlate with the risk of renal cell carcinoma? A dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Oncotarget* 6:13347–13358
312. Xu Y, Zhu M (2020) Novel exosomal miR-46146 transfer oxaliplatin chemoresistance in colorectal cancer. *Clin Transl Oncol* 22:1105–1116
313. Yamada H, Takahashi M, Watanuki M, Watanabe M, Hiraide S, Saijo K, Komine K, Ishioka C (2021) lncRNA HAR1B has potential to be a predictive marker for pazopanib therapy in patients with sarcoma. *Oncol Lett* 21:455
314. Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colás E, Silva AC, Fais S, Falcon-Perez JM, Ghobrial IM, Giebel B, Gimona M, Graner M, Gursel I, Gursel M, Heegaard NHH, Hendrix A, Kierulf P, Kokubun K, Kosanovic M, Kralj-Iglic V, Krämer-Albers E-M, Laitinen S, Lässer C, Lener T, Ligeti E, Linē A, Lipps G, Llorente A, Lötvall J, Manček-Keber M, Marcilla A, Mittelbrunn M, Nazarenko I, Hoen ENMN-‘t, Nyman TA, O’Driscoll L, Olivan M, Oliveira C, Pállinger É, del Portillo HA, Reventós J, Rigau M, Rohde E, Sammar M, Sánchez-Madrid F, Santarém N, Schallmoser K, Ostensfeld MS, Stoorvogel W, Stukelj R, Van der Grein SG, Vasconcelos MH, Wauben MHM, De Wever O (2015) Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 4:27066
315. Yang D, Zhang W, Zhang H, Zhang F, Chen L, Ma L, Larcher LM, Chen S, Liu N, Zhao Q, Tran PHL, Chen C, Veedu RN, Wang T (2020) Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - efforts for efficient exosome-based theranostics. *Theranostics* 10:3684–3707
316. Yang J, Yan J, Liu B (2018) Targeting VEGF/VEGFR to Modulate Antitumor Immunity. *Front Immunol* 9:978

317. Yang S, Wang D, Li J, Xu H, Shen H, Chen X, Zhou S, Zhong S, Zhao J, Tang J (2017) Predictive role of GSTP1-containing exosomes in chemotherapy-resistant breast cancer. *Gene* 623:5–14
318. Yang T, Martin P, Fogarty B, Brown A, Schurman K, Phipps R, Yin VP, Lockman P, Bai S (2015) Exosome Delivered Anticancer Drugs Across the Blood-Brain Barrier for Brain Cancer Therapy in Danio Rerio. *Pharm Res* 32:2003–2014
319. Yang Y, Li C-W, Chan L-C, Wei Y, Hsu J-M, Xia W, Cha J-H, Hou J, Hsu JL, Sun L, Hung M-C (2018) Exosomal PD-L1 harbors active defense function to suppress T cell killing of breast cancer cells and promote tumor growth. *Cell Res* 28:862–864
320. Ye S, Li Z-L, Luo D, Huang B, Chen Y-S, Zhang X, Cui J, Zeng Y, Li J (2014) Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget* 5:5439–5452
321. Yeung Y-G, Stanley ER (2009) A solution for stripping antibodies from polyvinylidene fluoride immunoblots for multiple reprobing. *Anal Biochem* 389:89–91
322. Yokoyama N, Matsunobu T, Matsumoto Y, Fukushi J, Endo M, Hatano M, Nabeshima A, Fukushima S, Okada S, Iwamoto Y (2017) Activation of ERK1/2 Causes Pazopanib Resistance via Downregulation of DUSP6 in Synovial Sarcoma Cells. *Sci Rep* 7:45332
323. Yu D, Wu Y, Zhang X, Lv M, Chen W, Chen X, Yang S, Shen H, Zhong S, Tang J, Zhao J (2016) Exosomes from adriamycin-resistant breast cancer cells transmit drug resistance partly by delivering miR-222. *Tumor Biol* 37:3227–3235
324. Yu D, Li Y, Wang M, Gu J, Xu W, Cai H, Fang X, Zhang X (2022) Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy. *Mol Cancer* 21:56
325. Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP (2015) Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience* 65:783–797
326. Zhang H, Yan C, Wang Y (2021) Exosome-mediated transfer of circHIPK3 promotes trastuzumab chemoresistance in breast cancer. *J Drug Target* 29:1004–1015
327. Zhang J, Yang PL, Gray NS (2009) Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* 9:28–39
328. Zhang L, Yu D (2019) Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1871:455–468
329. Zhang Q, Liu R-X, Chan K-W, Hu J, Zhang J, Wei L, Tan H, Yang X, Liu H (2019) Exosomal transfer of p-STAT3 promotes acquired 5-FU resistance in colorectal cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* CR 38:320
330. Zhang Z, Yin J, Lu C, Wei Y, Zeng A, You Y (2019) Exosomal transfer of long non-coding RNA SBF2-AS1 enhances chemoresistance to temozolomide in glioblastoma. *J Exp Clin Cancer Res* 38:166

331. Zhao Y, Jin L-J, Zhang X-Y (2021) Exosomal miRNA-205 promotes breast cancer chemoresistance and tumorigenesis through E2F1. *Aging* 13:18498–18514
332. Zheng P, Chen L, Yuan X, Luo Q, Liu Y, Xie G, Ma Y, Shen L (2017) Exosomal transfer of tumor-associated macrophage-derived miR-21 confers cisplatin resistance in gastric cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* 36:53
333. Zhou Y, Zhang Y, Gong H, Luo S, Cui Y (2021) The Role of Exosomes and Their Applications in Cancer. *Int J Mol Sci* 22:12204
334. Zhu Q, Ling X, Yang Y, Zhang J, Li Q, Niu X, Hu G, Chen B, Li H, Wang Y, Deng Z (2019) Embryonic Stem Cells-Derived Exosomes Endowed with Targeting Properties as Chemotherapeutics Delivery Vehicles for Glioblastoma Therapy. *Adv Sci* 6:1801899
335. Zhu X, Badawi M, Pomeroy S, Sutaria DS, Xie Z, Baek A, Jiang J, Elgamal OA, Mo X, Perle KL, Chalmers J, Schmittgen TD, Phelps MA (2017) Comprehensive toxicity and immunogenicity studies reveal minimal effects in mice following sustained dosing of extracellular vesicles derived from HEK293T cells. *J Extracell Vesicles* 6:1324730
336. Zhuang L, Zhang B, Liu X, Lin L, Wang L, Hong Z, Chen J (2021) Exosomal miR-21-5p derived from cisplatin-resistant SKOV3 ovarian cancer cells promotes glycolysis and inhibits chemosensitivity of its progenitor SKOV3 cells by targeting PDHA1. *Cell Biol Int* 45:2140–2149
337. Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, Sun D, Zhang S, Axtell RC, Ju S, Mu J, Zhang L, Steinman L, Miller D, Zhang H-G (2011) Treatment of Brain Inflammatory Diseases by Delivering Exosome Encapsulated Anti-inflammatory Drugs From the Nasal Region to the Brain. *Mol Ther* 19:1769–1779
338. Zigeuner R, Golbeck SV, Pichler M (2016) Nierenparenchymtumoren. In: Michel MS, Thüroff JW, Janetschek G, Wirth, M (eds) *Die Urologie*. Springer Reference Medizin. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 327-346
339. Zisman A, Pantuck AJ, Wieder J, Chao DH, Dorey F, Said JW, deKernion JB, Figlin RA, Belldegrun AS (2002) Risk Group Assessment and Clinical Outcome Algorithm to Predict the Natural History of Patients With Surgically Resected Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 20:4559–4566
340. Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S (1998) Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes. *Nat Med* 4:594–600
341. Znaor A, Lortet-Tieulent J, Laversanne M, Jemal A, Bray F (2015) International Variations and Trends in Renal Cell Carcinoma Incidence and Mortality. *Eur Urol* 67:519–530

9. Appendix

9.1. IC-50-Experimente für Passage 62/63 (Versuch 3 und 4)

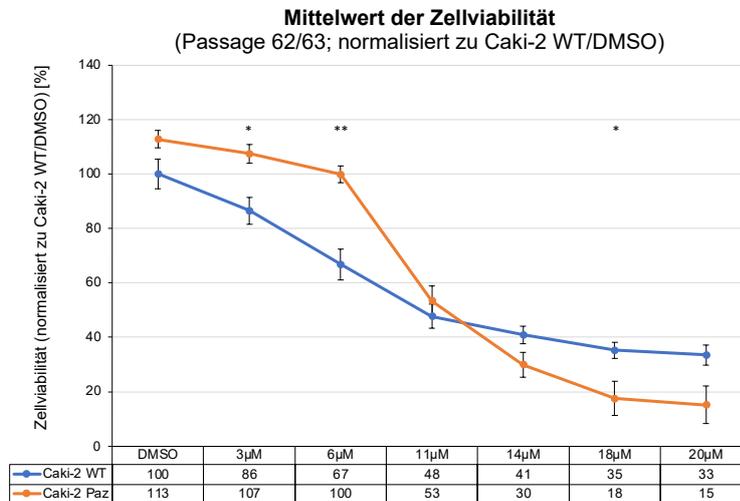


Abbildung 31 Mittelwerte der Zellviabilität (P. 62/63)

der Caki-2 WT im Vergleich zu Caki-2 Paz (normalisiert zu Caki-2 WT unter DMSO) unter 0,25% DMSO und Pazopanib (3 µM, 6 µM, 11 µM, 14 µM, 18 µM, 20 µM); Mittelwert der Viabilität der 4 biologischen Replikate von Versuch 3 und 4 mit Standardfehlern; Vergleich Viabilität Caki-2 WT zu Caki-2 Paz: T-Test DMSO: $p = 0,0910$; T-Test 3 µM: $p = 0,0134$; T-Test 6 µM: $p = 0,0020$; T-Test 11 µM: $p = 0,4556$; T-Test 14 µM: $p = 0,0980$; T-Test 18 µM: $p = 0,0447$; T-Test 20 µM: $p = 0,0594$; * $0,01 \leq p < 0,05$; ** $0,001 \leq p < 0,01$; *** $p < 0,001$

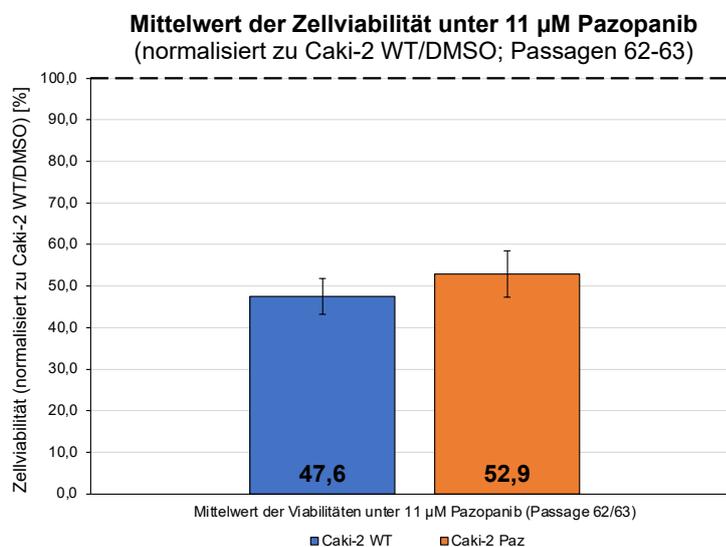


Abbildung 32 Mittelwert der Zellviabilität unter 11 µM Pazopanib (P. 62/63)

(normalisiert zu Caki-2 WT unter DMSO (gestrichelte Linie bei 100%)) mit Standardfehlern; Mittelwert der Viabilitäten aus Versuch 3 und 4; T-Test: $p = 0,45$ ($p > 0,05$)

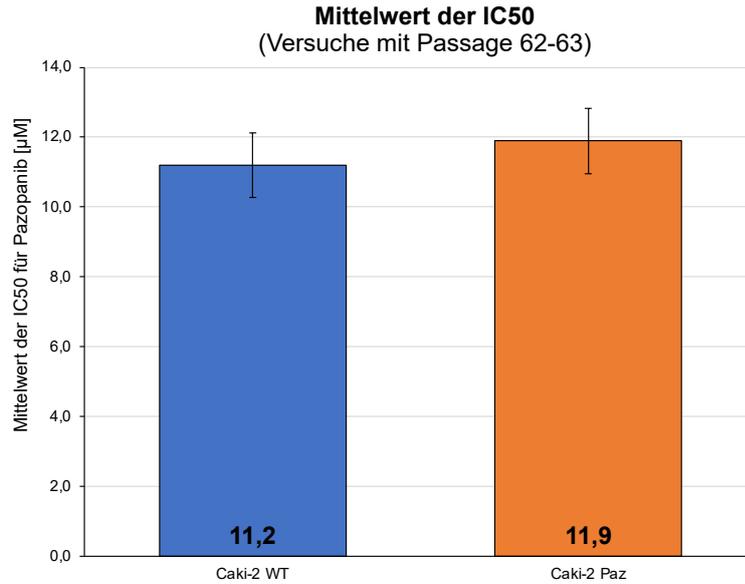


Abbildung 33 Mittelwert der IC50 für Caki-2 WT und Caki-2 Paz (P. 62/63) mit Standardfehlern, T-Test: $p = 0,60$ ($p > 0,05$)

9.2. Western Blots

9.2.1. Western Blot 1

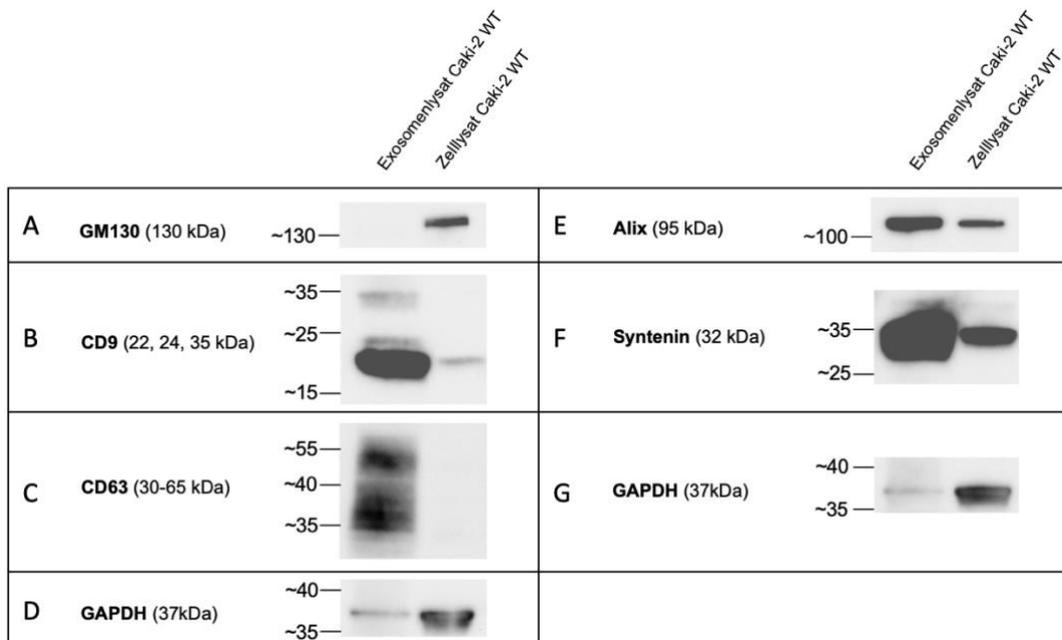


Abbildung 34 Western Blot 1

Lysate von Caki-2 WT Exosomen und Caki-2 WT-Zellen (Ladung: 6 µg Protein/ Tasche) A) Zellmarker GM-130; B) Exosomenmarker CD9; C) Exosomenmarker CD63; D) Ladekontrolle GAPDH für Membran 1 und Membran 3; E) Exosomenmarker Alix; F) Exosomenmarker Syntenin; G) Ladekontrolle GAPDH für Membran 2 und Membran 4

9.2.2. Western Blot 2

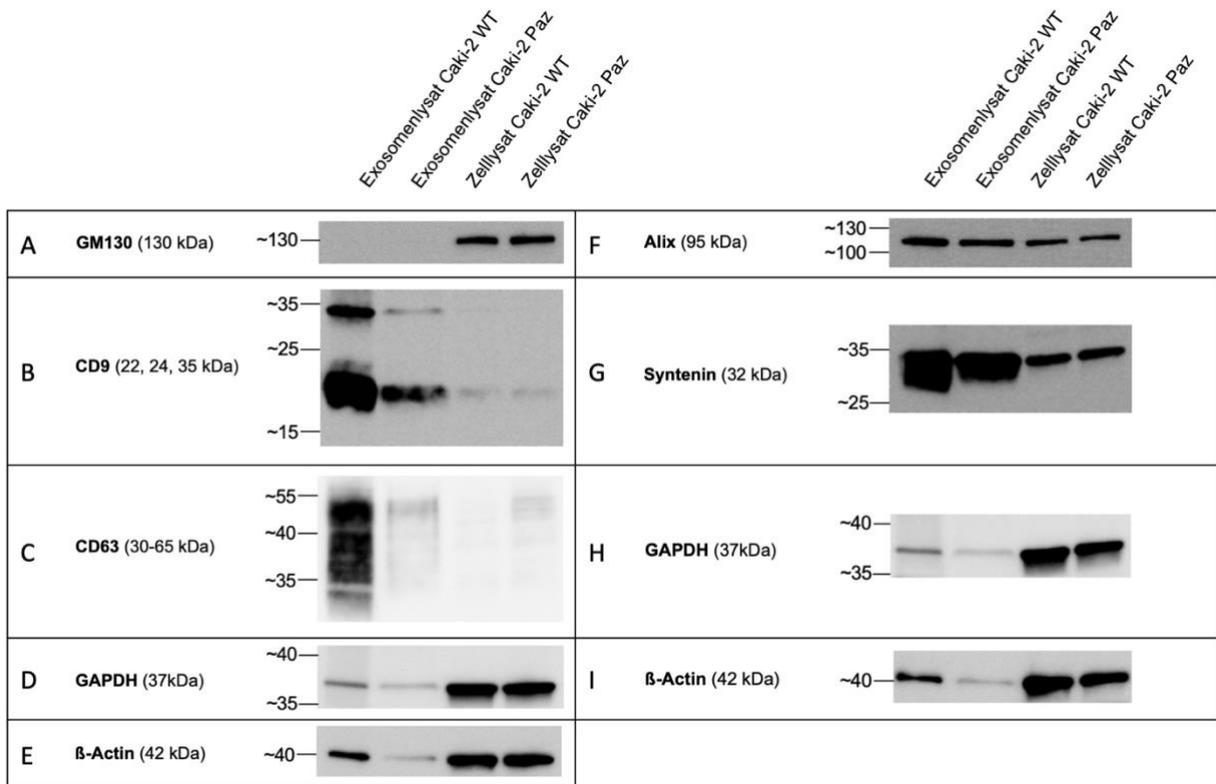


Abbildung 35 Western Blot 2 zum Nachweis der exosomalen Marker

Ladung: 6 µg Protein/Tasche mit Zell- und Exosomenlysaten von Caki-2 WT und Caki-2 Paz; A) Nachweis des Zellmarkers GM-130 in Zelllysaten; B) Nachweis des Exosomenmarkers CD9; C) Nachweis des Exosomenmarkers CD63; D) Ladekontrolle mit GAPDH für Membran 1 und Membran 3; E) Ladekontrolle mit β-Actin für Membran 1 und Membran 3; F) Nachweis des Exosomenmarkers Alix; G) Nachweis des Exosomenmarkers Syntenin; H) Ladekontrolle mit GAPDH für Membran 2 und Membran 4; I) Ladekontrolle mit β-Actin für Membran 2 und Membran 4

9.2.3. Zusatzabbildungen Western Blot 3

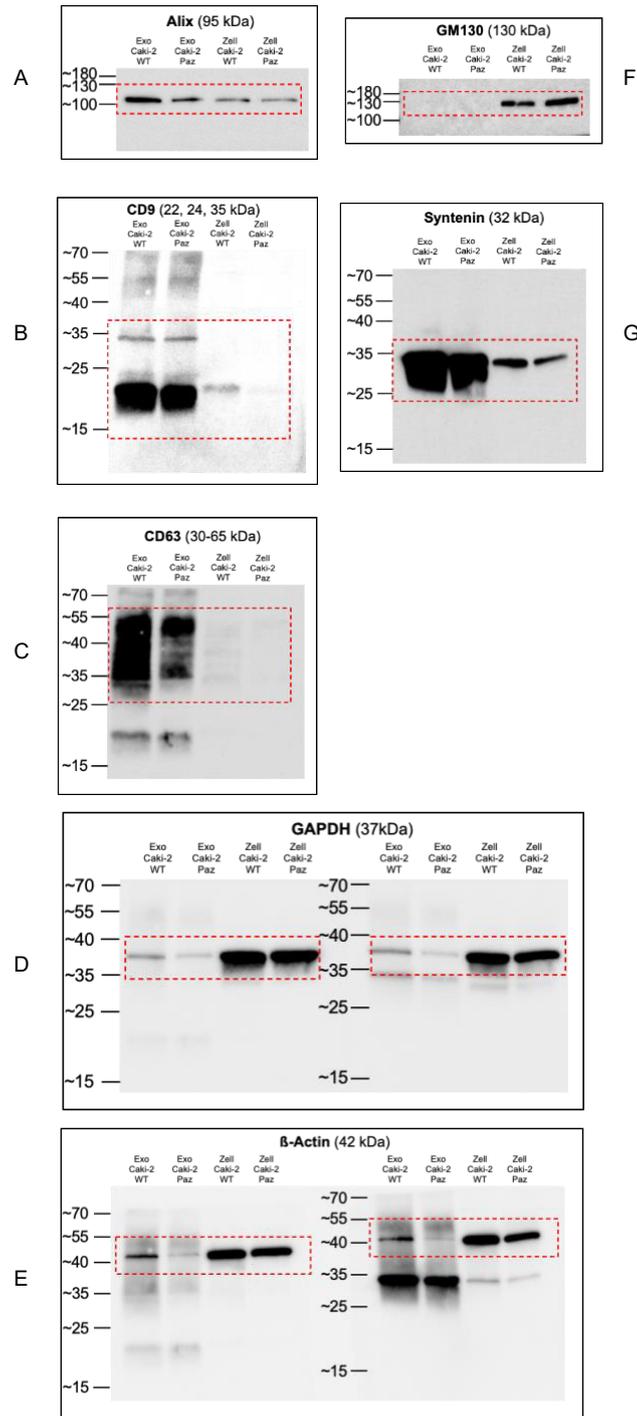


Abbildung 36 Zusatzabbildungen Western Blot 3

Ladung: 6 µg Protein/Tasche; Darstellung der Membranen inklusive Schnittlinien (in rot), entlang derer die Abschnitte, die im Hauptteil zu sehen sind, entnommen wurden. A) Exosomenmarker Alix; B) Exosomenmarker CD9; C) Exosomenmarker CD63; D) Ladekontrolle mit GAPDH; E) Ladekontrolle mit β-Actin; F) Zellmarker GM-130; G) Exosomenmarker Syntenin; Legende: Exo Caki-2 WT= Exosomenlysat der Caki-2 WT; Exo Caki-2 Paz= Exosomenlysat der Caki-2 Paz; Zell Caki-2 WT= Zelllysat der Caki-2 WT; Zell Caki-2 Paz= Zelllysat der Caki-2 Paz

9.3. BCA-Analysen für Western Blot 3

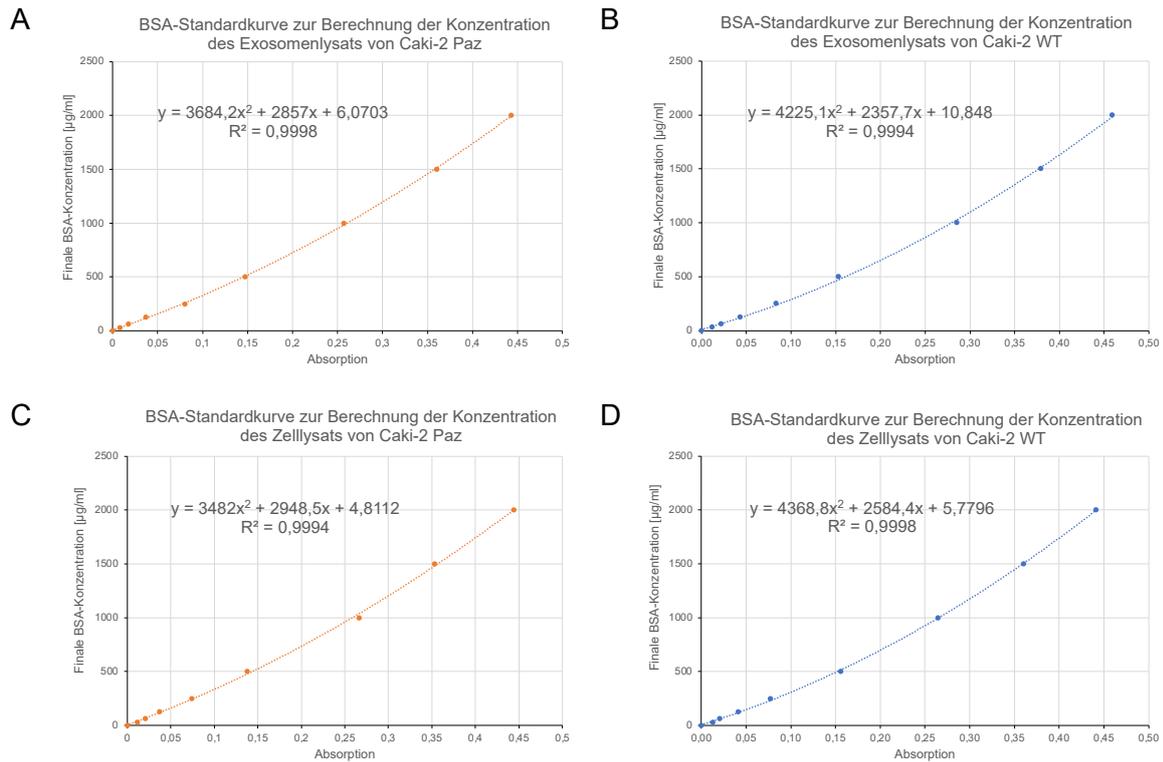


Abbildung 37 BSA-Standardkurven

Finale BSA-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$] aufgetragen gegen die gemessene Absorption inklusive der Gleichungen zu den Trendlinien zur Berechnung der Probenkonzentrationen für Western Blot 3; A) BSA-Standardkurve zur Berechnung der Konzentration des Exosomenlysats von Caki-2 Paz; B) BSA-Standardkurve zur Berechnung der Konzentration des Exosomenlysats von Caki-2 WT; C) BSA-Standardkurve zur Berechnung der Konzentration des Zelllysats von Caki-2 Paz; D) BSA-Standardkurve zur Berechnung der Konzentration des Zelllysats von Caki-2 WT

10. Dank

Mein Dank gilt an allererster Stelle Frau Prof. Dr. Junker, die dieses Projekt ermöglicht und mir bei Fragen jederzeit geholfen und mich motiviert hat. Frau Dr. rer. nat. Zaccagnino, von der die Idee für das Projekt und dessen Umsetzung stammt, danke ich für die Hilfe bei den Experimenten und der Auswertung sowie die gute Betreuung. Herrn Prof. Dr. Stöckle danke ich dafür, dass er mich darin unterstützt hat, in der Urologie zu promovieren und der mich überzeugen konnte, mich für eine experimentelle Doktorarbeit zu bewerben.

Auch bei den Mitarbeiter*innen des Forschungslabors möchte ich mich herzlich bedanken. Insbesondere bei Frau Jaschkowitz M.Sc. und Frau Tagat M.Sc. für die Einarbeitung in die Exosomenisolation und die Hilfe beim NTA-Assay. Frau Angeli danke ich für die Einarbeitung in die Zellkultur.

Zu guter Letzt gilt mein Dank meiner Familie, die mich mein ganzes Leben unterstützt und auch während der Promotion immer für mich da war.

11. Lebenslauf

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