

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Entwicklungs-genetik

Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) im Nierenzellkarzinom  
Einfluss auf die Antigenexpression und Immunerkennung

Markus R. Schmid

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. S. Scherer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. W. Wurst

2. apl. Prof. Dr. D. J. Schendel

(Ludwig-Maximilians-Universität München)

Die Dissertation wurde am 21.05.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 17.07.2008 angenommen.

*Denker sind überall willkommen...*

*...Andersdenker immer woanders.*

Dr. med. Klaus D. Koch

---

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>2</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Das Nierenzellkarzinom .....</b>	<b>5</b>
1.1.1 RCC Tumorsubtypen .....	5
1.1.2 RCC Tumormilieu .....	7
<b>1.2 EMT .....</b>	<b>10</b>
1.2.1 Der Cadherin-Switch.....	12
1.2.2 Zytoskelett-Umstrukturierung und Migration.....	16
1.2.3 EMT-induzierende Wachstumsfaktoren und extrazelluläre Signale .....	19
<b>1.3 Angeborene und adaptive Immunität im RCC .....</b>	<b>22</b>
<b>1.4 Therapie des RCC .....</b>	<b>24</b>
1.4.1 Therapie des RCCs mit „small molecules“ und monoklonalen Antikörpern.....	24
1.4.2 Hormon- und Immun-Therapie des RCCs .....	25
<b>1.5 Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>26</b>
<b>2 MATERIALIEN .....</b>	<b>28</b>
<b>2.1 Geräte.....</b>	<b>28</b>
<b>2.2 Sonstige Materialien .....</b>	<b>29</b>
<b>2.3 Chemikalien .....</b>	<b>30</b>
<b>2.4 Puffer und Lösungen .....</b>	<b>32</b>
<b>2.5 Kits .....</b>	<b>32</b>
<b>2.6 Zellkultur Medien.....</b>	<b>33</b>
<b>2.7 Zellen.....</b>	<b>33</b>
<b>2.8 Enzyme.....</b>	<b>34</b>
<b>2.9 Zytokine/Wachstumsfaktoren .....</b>	<b>34</b>
<b>2.10 Antikörper .....</b>	<b>34</b>
<b>2.11 Plasmide .....</b>	<b>35</b>
<b>2.12 siRNA .....</b>	<b>35</b>
<b>2.13 Oligonukleotide.....</b>	<b>36</b>
<b>3 METHODEN .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1 Methoden zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen.....</b>	<b>38</b>

---

3.1.1	Grundtechniken der Zellkultur.....	38
3.1.2	Kultivierung von Sphroiden.....	38
3.1.3	Kultivierung von humanen Primärzellen und Effektorzellen .....	38
<b>3.2</b>	<b>Durchflusszytometrie (FACS) .....</b>	<b>39</b>
3.2.1	Färbung von Oberflächenproteinen.....	39
3.2.2	Färbung von intrazellulären Proteinen.....	40
3.2.3	Sortierung von Zellen mit dem MoFlo™ .....	41
<b>3.3</b>	<b>Magnetische Anreicherung von NK-Zellen .....</b>	<b>41</b>
<b>3.4</b>	<b>Stimulation von Zellen .....</b>	<b>42</b>
<b>3.5</b>	<b>Proteinanalytische Arbeiten .....</b>	<b>42</b>
3.5.1	Western-Transfer.....	42
3.5.1.1	Lyse der Zellen.....	42
3.5.1.2	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	43
3.5.1.3	Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese .....	43
3.5.1.4	Detektion der Proteine mit Antikörpern .....	43
<b>3.6</b>	<b>Molekularbiologische Arbeiten mit DNA .....</b>	<b>44</b>
3.6.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	44
3.6.2	Restriktionsverdau von DNA.....	44
3.6.3	Verknüpfung von DNA-Fragmenten .....	45
3.6.4	DNA-Aufreinigung.....	45
3.6.5	Plasmidgewinnung aus <i>E. coli</i> .....	45
3.6.6	DNA-Extraktion aus humanen Zelllinien .....	46
3.6.7	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration .....	46
3.6.8	Sequenzanalyse .....	46
3.6.9	cDNA-Synthese .....	46
3.6.10	Quantitative RT-PCR .....	47
3.6.11	Gelelektrophorese von DNA .....	49
<b>3.7</b>	<b>Molekularbiologische Arbeiten mit RNA .....</b>	<b>49</b>
3.7.1	RNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen und kryokonserviertem Gewebe ....	49
3.7.2	RNA-Extraktion aus Formalin-fixierten Gewebepreparaten.....	50
3.7.3	Laser-Mikrodissektion von Formalin-fixierten Gewebepreparaten .....	50
3.7.3.1	PALM MicroBeam.....	50
3.7.3.2	Arcturus <sup>XT</sup> PixCell Ite.....	50
3.7.4	Herstellung von <i>ivt</i> RNA.....	51
3.7.5	Gelelektrophorese von RNA .....	51
<b>3.8</b>	<b>Transfektion von humanen Zellen .....</b>	<b>51</b>
3.8.1	Stabile Transfektion von DNA.....	52
3.8.2	Transiente Transfektion von RNA.....	52
<b>3.9</b>	<b>Immunfluoreszenz-Mikroskopie von humanen Zellen .....</b>	<b>52</b>
<b>3.10</b>	<b>Immunhistochemie .....</b>	<b>53</b>
<b>3.11</b>	<b>Reporter Assay.....</b>	<b>54</b>
<b>3.12</b>	<b>Funktionelle Assays .....</b>	<b>55</b>
3.12.1	Spaltwanderungs-Versuch.....	55
3.12.2	<sup>51</sup> Chrom-Freisetzungs-Versuch .....	55

---

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>EMT-Status von Nierenzellkarzinom-Zellen in vitro .....</b>	<b>57</b>
4.1.1	Untersuchungen zur Bestimmung des epithelialen bzw. mesenchymalen Phänotyps .....	57
4.1.2	Modulation des Phänotyps von RCC-Zelllinien .....	64
4.1.3	Reexpression von E-Cadherin durch epigenetische Modulation .....	73
4.1.4	Der Einfluss von IFN- $\alpha$ , Multi-Kinase- und mTOR-Inhibitoren auf die E-Cadherin-Expression .....	76
<b>4.2</b>	<b>In situ Untersuchungen zur EMT .....</b>	<b>77</b>
4.2.1	Expression von EMT-Markern in vier verschiedenen RCC-Subtypen .....	77
4.2.2	Immunhistochemische Untersuchungen von EMT-Markern in vier verschiedenen RCC-Subtypen.....	82
4.2.3	mRNA- und immunhistochemische-Expressionsanalyse von EMT-assoziierten Molekülen in sarkomatoiden und klarzelligen RCCs .....	84
<b>4.3</b>	<b>Modulation von Hypoxie-regulierten Genen in vitro .....</b>	<b>87</b>
4.3.1	Modulation der VHL-Expression durch Gentransfer .....	87
4.3.2	Modulation der HIF- $\alpha$ -Expression durch RNA-Inhibition und RNA-Transfer.....	89
<b>4.4</b>	<b>Modulation der E-Cadherin-Expression in vitro .....</b>	<b>90</b>
4.4.1	Herstellung von stabilen E-Cadherin-Transfektanten .....	90
<b>4.5</b>	<b>Einfluss der E-Cadherin-Expression auf die immunologische Erkennung durch Effektorzellen .....</b>	<b>94</b>
4.5.1	Nicht-MHC-restringierte Erkennung von E-Cadherin-Transfektanten .....	94
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>100</b>
<b>5.1</b>	<b>Epithelialer und mesenchymaler Phänotyp von RCC-Zelllinien .....</b>	<b>100</b>
<b>5.2</b>	<b>EMT-Status im RCC (in situ).....</b>	<b>104</b>
<b>5.3</b>	<b>In vitro MET durch Modulation der Proteinexpression von E-Cadherin und Hypoxie-regulierten Molekülen.....</b>	<b>110</b>
<b>5.4</b>	<b>Vergleich der immunologischen Erkennung des epithelialen und mesenchymalen Phänotyps .....</b>	<b>112</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>ZUSÄTZLICHE ABBILDUNGEN.....</b>	<b>117</b>
<b>8</b>	<b>REFERENZEN.....</b>	<b>122</b>
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>131</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>134</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Das Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom (RCC, renal cell carcinoma) ist mit 85 % die häufigste neoplastische Erkrankung der Niere im Erwachsenenalter und macht einen Anteil von 1-2 % aller bösartigen Tumoren aus. In Deutschland wird die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen bei Frauen auf etwa 6400 und bei Männern auf 10300 geschätzt. Das übliche Alter bei Diagnose liegt zwischen 50 und 70 Jahren. Ein Viertel bis ein Drittel der Patienten haben zu diesem Zeitpunkt bereits Metastasen. In nur 2 % der Fälle sind beide Nieren bei Erstdiagnose betroffen, dabei sind Patienten mit genetisch-bedingtem RCC, wie dem von Hippel-Lindau-Syndrom (in Verbindung mit dem familiären RCC) und der tuberösen Sklerose, am häufigsten betroffen. Zu den genetisch prädisponierten RCCs zählt auch das familiäre papilläre RCC<sup>[14]</sup>. Weitere prädisponierende genetische Faktoren finden sich bei Patienten mit einer polyzystischen Nierendegeneration und Sichelzellanämie<sup>[7,15]</sup>. Als weitere Risikofaktoren wurden neben dem Alter und dem männlichen Geschlecht, Zigarettenrauch, Übergewicht, Kadmium (aus Batterien), ionisierende Strahlung und toxische Chemikalien, wie aromatische Kohlenwasserstoffe, gefunden<sup>[16]</sup>. Das Ernährungsverhalten spielte hier ebenfalls eine bedeutende Rolle. So kam es bei eiweißreicher Diät bzw. bei häufigen Gewichtsschwankungen, besonders bei Frauen, zu einer erhöhten Inzidenz von RCCs<sup>[17]</sup>. Denselben Effekt erzielten einige Nahrungsmittel wie z.B. tierische Fette und ein hoher Fleischverzehr (insbesondere „rotes“ Fleisch), sowie Milch, Margarine und Zucker, wohingegen Obst das Erkrankungsrisiko senkte<sup>[18]</sup>.

Die Prognose des RCCs hängt entscheidend vom Ausmaß der Erkrankung bei Erstdiagnose ab. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate beträgt bei lokal begrenzten Tumoren 70-80 %, bei lokal fortgeschrittenen Tumoren 20-60 % und bei Fernmetastasen unter 10 %. Die Ein-Jahres-Überlebensrate von metastasierten RCCs (mRCC) beträgt ohne Therapie lediglich 15 %, wobei die Anzahl der befallenen Organe eine entscheidende Rolle spielt. Metastasen in der Leber und im Skelett haben die schlechteste Prognose, Lungenmetastasen eine etwas günstigere Prognose<sup>[10]</sup>.

**Tab.1: Häufigkeitsverteilung der Fernmetastasen von RCCs<sup>[10]</sup>.**

Zielorgan	Häufigkeit
Lunge	55-61 %
Lymphknoten	26-34 %
Leber	20-33 %
Skelettsystem	22-32 %
Nebenniere	19 %
Gehirn	3-5 %

#### 1.1.1 RCC Tumorsubtypen

Das RCC ist ein epithelialer Tumor, der seinen Ursprung im Tubulusepithel der Niere hat. In klinischen wie in genetischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass

das RCC nicht als eine Tumorerkrankung angesehen werden kann, sondern es sich vielmehr um verschiedene Tumoren innerhalb der Niere handelt. Jede dieser Tumorerkrankung ist gekennzeichnet durch ein bestimmtes histologisches Erscheinungsmuster, unterschiedliche zugrunde liegende genetische Alterationen und unterschiedliche Therapie-Ansprechraten. Basierend auf der „Mainz-Klassifikation“ nach Thoenes (1986) wurde das RCC nach den pathomorphologischen Kriterien Wachstumsmuster, Zelltyp und „Grading“ eingeteilt. Das Wachstumsmuster wird unterteilt in kompakt, drüsig, tubulopapillär und zystisch. Fünf Zelltypen des Tumors werden unterschieden: der klarzellige, der chromophile/papilläre (weiter unterteilt in basophil und eosinophil), der chromophobe (weiter unterteilt in typisch oder eosinophil), der onkozytische und der spindelzellige oder pleomorphe Typ, auch Duct-Bellini- oder Sammelrohr-Karzinom genannt. Basierend auf dem Ausmaß der Zellkernatypien bzw. der Tumorzeldifferenzierung erfolgt eine weitere Einteilung in die Gradingstufen G1- G3/4 (G1 gut differenziert; G2 mäßig differenziert; G3/4 schlecht differenziert/undifferenziert).

**Tab.2: Häufigkeitsverteilung, Ursprungsgewebe und chromosomale Aberrationen der verschiedenen RCC-Subtypen nach der Mainz-Klassifikation<sup>[4-6]</sup>.**

Tumorsubtyp	Häufigkeit	Ursprungsgewebe	chromosomale Aberrationen
klarzelliges RCC	76 %	proximaler Tubulus	3p, 17
chromophiles/papilläres RCC	10 %		7, 17, Y
chromophobes RCC	5 %	distaler Tubulus	1, 2, 6, 10, 13, 17, 21
Onkozytom	5 %	Sammelrohrsystem	1, Y
Ductus-Bellini-Karzinom	1 %		1q, 6p, 8p, 13q, 21q
spindelzelliges RCC	1 %		
nicht klassifizierbares RCC	2 %		

Das TNM-System der „Union International Contre le Cancer“ (UICC), entwickelt von P. Denoix, unterteilt die Tumor-Klassifikation nach der anatomischen Tumorausbreitung. Danach gibt „T“ Auskunft über die Größe oder Ausdehnung des Primärtumors, „N“ beschreibt die Ausbreitung des Tumors auf die regionalen Lymphknoten und „M“ bezeugt das Vorliegen von Fernmetastasen. Aktuell gilt die 6. Auflage der TNM-Klassifikation<sup>[19]</sup>.

Das klarzellige RCC (ccRCC), als häufigster Tumor unter den RCCs, zeichnet sich sowohl in der sporadischen, als auch im Rahmen der „von Hippel-Lindau-Syndrom“ auftretenden Form, genetisch durch Alterationen des kurzen Arms des Chromosoms 3 aus. In dieser Region liegt das VHL-Tumorsuppressorgen, das in 50-85 % der ccRCCs somatische Mutationen aufweist. In zusätzlich 19 % der ccRCCs konnte eine Inaktivierung des VHL-Gens durch epigenetische Modifikationen

(Hypermethylierung) gezeigt werden<sup>[20]</sup>. Der Verlust des VHL-Gens spielt in der Entstehung und Progression des ccRCCs eine entscheidende Rolle<sup>[21]</sup>.

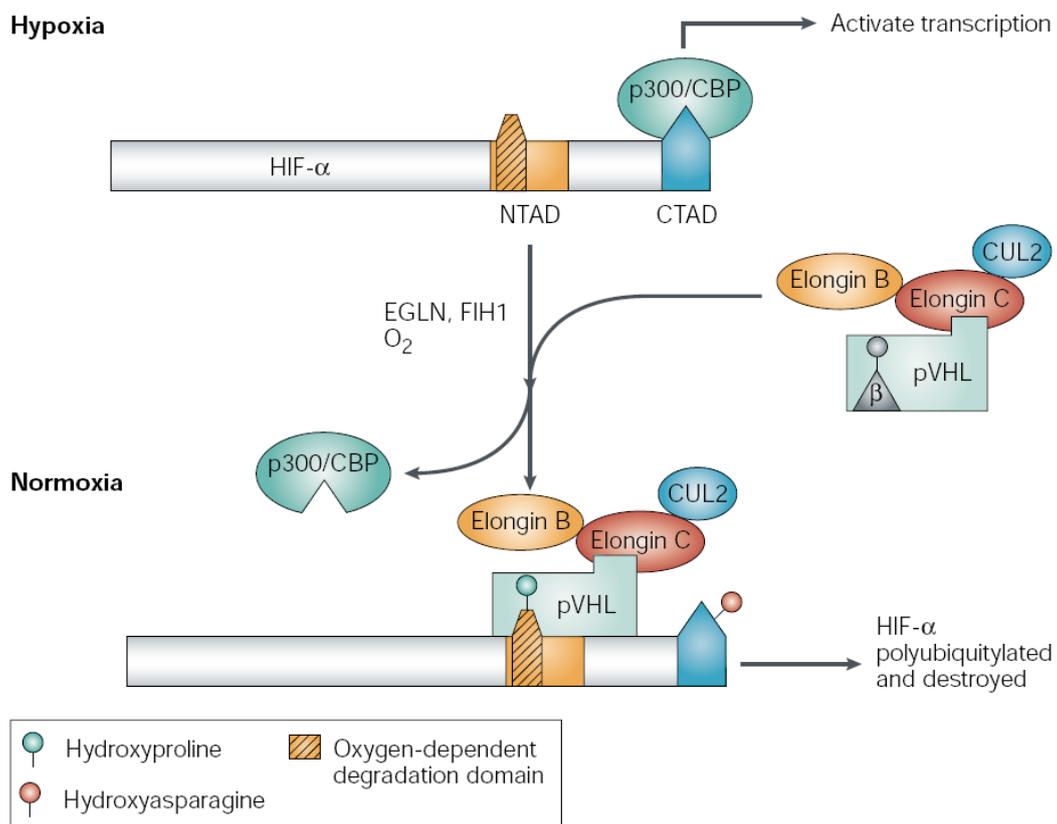
Die schlecht differenzierte spindelzellige (sarkomatoide) Variante des RCCs wurde in allen Tumorsubtypen gefunden. Da es keinen Hinweis auf eine *de novo* Entstehung gibt, wird es als eine Manifestation von höhergradigen RCCs angesehen. Hierbei nimmt ein primär epithelialer Tumor im Laufe der zunehmenden Dedifferenzierung einen „Sarkom-ähnlichen“ Phänotyp an. Allgemein zeichnen sich diese Tumoren durch ihre hochmaligne Potenz und extrem hohe Proliferation mit rapidem Wachstums- und Metastasierungsverhalten aus. Unbehandelt führt das sarkomatoide RCC innerhalb von 3,8 - 6,8 Monaten zum Tod<sup>[22,23]</sup>. In einigen Fällen wurden rein sarkomatoide Tumoren diagnostiziert, bei denen der Ursprungstumor nicht mehr charakterisiert werden konnte. Diese Tumoren gehören in die Gruppe der unklassifizierten RCCs<sup>[24]</sup>.

### 1.1.2 RCC Tumormilieu

Das Milieu eines Tumors unterscheidet sich wesentlich von dem Milieu eines gesunden Gewebes. Dabei spielen Faktoren wie Stoffwechsel, pH-Wert und Vaskularisierung eine entscheidende Rolle. Aufgrund der starken Proliferation von Tumorzellen kommt es zu einer schlechten Blutversorgung innerhalb des Tumors, wodurch ein geringer Sauerstoffpartialdruck (Hypoxie) entsteht. Da ein Tumor ohne Angiogenese nicht größer als 2 mm wachsen kann<sup>[25]</sup>, wird durch ein Rückkopplungssystem über VEGF (vascular endothelial growth factor) eine Neovaskularisierung initiiert<sup>[26,27]</sup>. Die Hypoxie hat zur Folge, dass sich durch die anaerobe Glykolyse der Tumorzellen Stoffwechselprodukte, wie Laktat und Protonen, ansammeln, die zu einer Erniedrigung des pH-Werts führen und somit zur Azidose des Tumors. Nicht zuletzt trägt der hohe Partialdruck von Kohlenstoffdioxid zu einer Azidose des Tumors bei<sup>[28]</sup>.

Besonders das klarzellige RCC zeichnet sich durch eine hohe Vaskularisierung aus. Dies ist unter anderem häufig auf eine gestörte Regulation des Hypoxie-Signalweges durch z.B. eine VHL-Inaktivierung zurückzuführen<sup>[21]</sup>. Das VHL-Gen kodiert zwei Protein-Isoformen (pVHL19 und pVHL30)<sup>[29]</sup>, die gemeinsam eine Reihe von Funktionen in der Zelle ausüben, wobei pVHL19 überwiegend im Zellkern lokalisiert ist und pVHL30 im Zytoplasma<sup>[30,31]</sup>. Dazu gehört die Organisation von Mikrotubuli, die Ziliogenese, der Aufbau der extrazellulären Fibronectin-Matrix (pVHL30) und Transkription (pVHL19), vermittelt durch die Interaktion mit Untereinheiten der RNA-Polymerase II und  $\beta$ -Catenin<sup>[1]</sup>. Durch den Verlust von VHL kann ein geordneter Aufbau der extrazellulären Matrix nicht stattfinden, was die hohe Vaskularisierung des Tumors ermöglicht<sup>[32]</sup>. Zusätzlich scheint VHL an der Plasmin-vermittelten

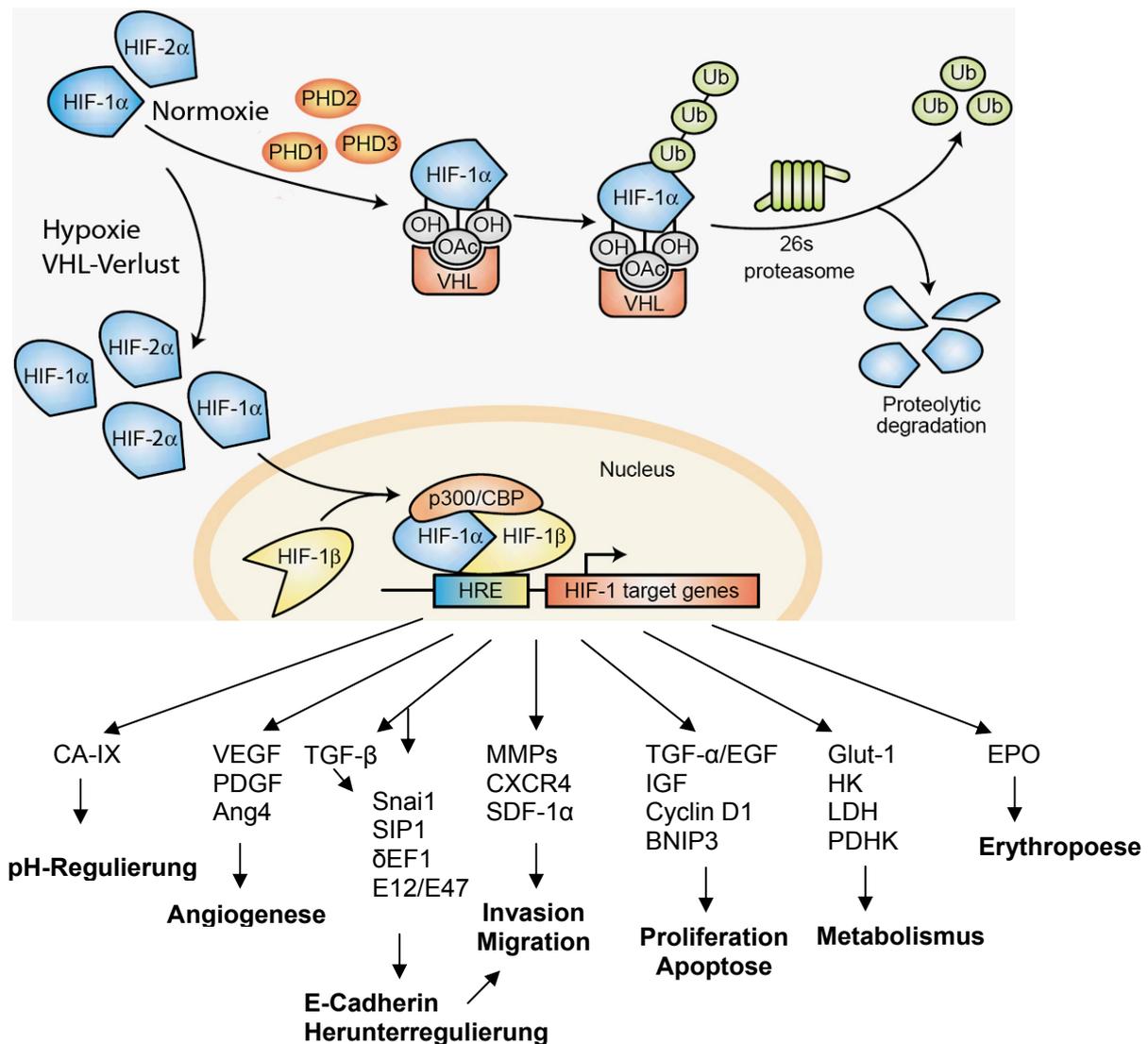
Proteolyse der Extrazellulärmatrix beteiligt zu sein<sup>[33]</sup>. Eine der am besten charakterisierten Funktionen jedoch übernimmt VHL bei der zellulären Antwort auf Sauerstoff. Gemeinsam mit Elongin B und C, Cullin 2 und Rbx1 bildet VHL einen E3-Ubiquitinligase-Komplex, wobei VHL als Substratbindungskomponente für die alpha Untereinheit von HIF (hypoxia inducible factor) -Proteinen fungiert (Abb.1). Diese werden in sauerstoffabhängiger Weise durch eine Hydroxylierung von konservierten



**Abb.1: Regulation von HIF-α durch VHL.** Beschreibung siehe Text. Entnommen aus Kaelin (2002)<sup>[1,2]</sup>. CBP: CREB-binding protein; CTAD: C-terminal transactivation domain; FIH1: factor inhibiting HIF-1; NTAD: N-terminal transactivation domain

Prolin-Resten innerhalb der sauerstoffabhängigen Abbaudomäne durch VHL gebunden und für den Abbau durch das 26S-Proteasom ubiquitiniert. Unter Hypoxiebedingungen oder bei einem Verlust von VHL findet eine Akkumulation von HIF-α im Zellkern statt. Nach der Dimerisierung mit der konstitutiv exprimierten HIF-β-Untereinheit bindet der Koaktivator-Komplex p300/CBP an die C-terminale Transaktivierungs-Domäne (CTAD), die bei Normoxie durch hydroxylierte Asparagin-Reste vor einer Bindung geschützt ist und aktiviert die Transkription von Hypoxie-regulierten Genen<sup>[1]</sup>. Bisher sind drei humane HIF-α Gene bekannt (HIF-1α, HIF-2α und HIF-3α), die alle unterschiedliche Funktionen und Spezifitäten besitzen, wobei HIF-2α das größte Transaktivierungspotential von Hypoxie-regulierten Genen hat, da es zusätzlich zu seiner eigenen Transaktivierungsspezifität von Genen auch die

Spezifität von HIF-1 $\alpha$  besitzt<sup>[34]</sup>. Während HIF-1 $\alpha$  eine eher Tumor-inhibierende Funktion durch die Regulation von BNIP3 (Bcl-2 nineteen kilodalton interacting protein 3), einem pro-apoptotischen Protein, zugeschrieben wird, konnte bei HIF-2 $\alpha$ -Überexpression eine tumorfördernde Funktion durch die Regulation von Cyclin D1, TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha) und VEGF beobachtet werden<sup>[35,36]</sup> (Abb.2). HIF-3 $\alpha$  ist das am wenigsten untersuchte Gen unter den HIF- $\alpha$ -Genen, jedoch wurde eine alternative Spleißvariante von HIF-3 $\alpha$  (HIF-3 $\alpha$ 4) charakterisiert, die eine dominant-negative Funktion über HIF-1 $\alpha$ <sup>[37]</sup> und HIF-2 $\alpha$ <sup>[38]</sup> besitzt, indem sie eine Bindung an



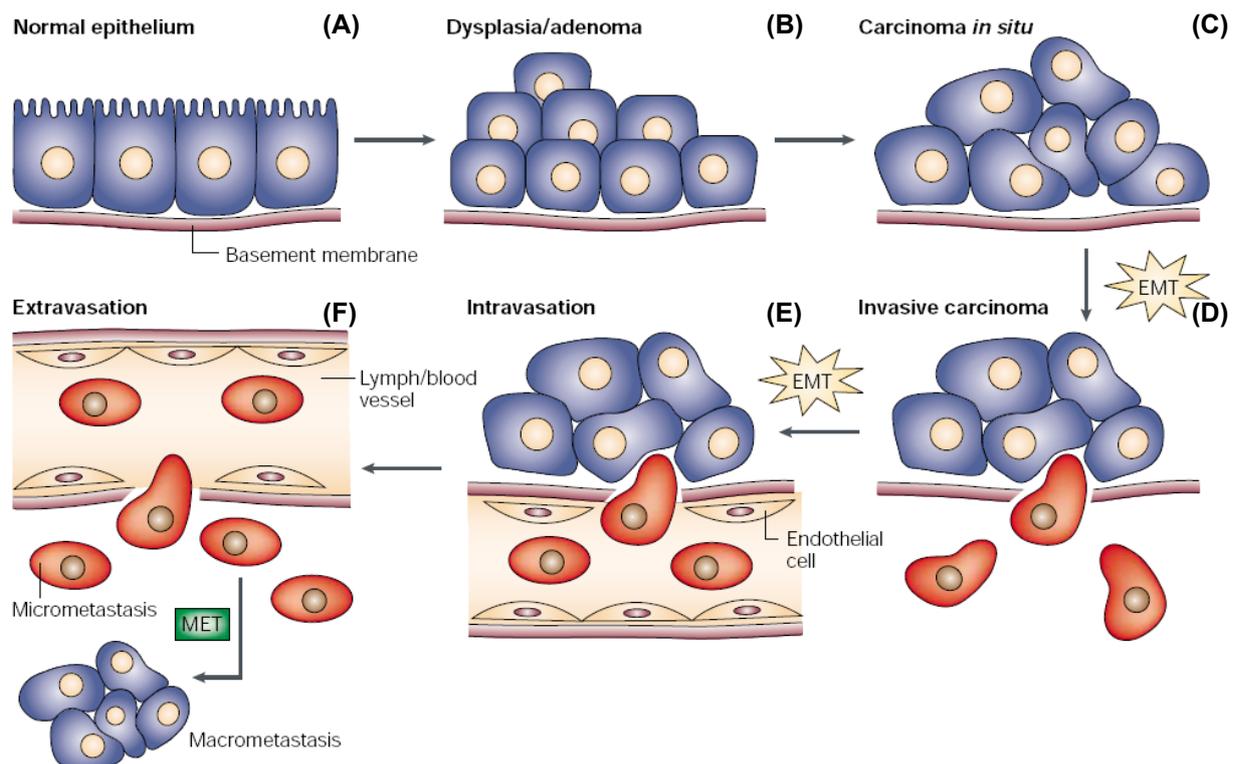
**Abb. 2: HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  regulieren eine Vielzahl an Genen.** Aus Carroll und Ashcroft (2005)<sup>[3]</sup>, modifiziert nach<sup>[7-9]</sup>. CBP: CREB-binding protein; Ang4: Angiopoietin 4; CA-IX: Carbonic anhydrase IX; EGF: Epidermal growth factor; EPO: Erythropoietin; Glut-1: Glucose transporter 1; HK: Hexokinase; HRE: Hypoxia-response element; IGF: Insulin-like growth factor; LDH: Lactate dehydrogenase; MMP: Matrixmetallo proteinase; PDGF: Platelet-derived growth factor; PDHK: Pyruvat dehydrogenase kinase; SDF-1 $\alpha$  (CXCL12): Stromal cell-derived factor-1; TGF: Transforming growth factor; Ub: Ubiquitin;

HREs (hypoxia responsive elements) in Promotoren/Enhancern von Hypoxie-regulierten Genen verhindert. HIF-3 $\alpha$  wird durch Sauerstoff reguliert, wobei die Expression bei Normoxie am höchsten ist. Auch bei weiteren Hypoxiemarkern konnte eine Regulation durch VHL gezeigt werden. So führte ein Verlust von VHL zur Expressionssteigerung der Karbonischen Anhydrase IX (CA-IX)<sup>[39]</sup>, für die eine Überexpression im klarzelligen und papillären RCC gefunden wurde<sup>[40]</sup>. Dabei wurde ausschließlich HIF-1 $\alpha$  mit seinen Kofaktoren die Expressionskontrolle von CA-IX zugeschrieben<sup>[41]</sup>. Die Hauptaufgabe des membranständigen Enzyms CA-IX besteht in der reversiblen Hydroxylierung von Kohlenstoffdioxid zu Bicarbonat und Protonen<sup>[42,43]</sup>, was zu einer Ansäuerung des extrazellulären Milieus führt und somit zur Tumorprogression beiträgt<sup>[44,45]</sup>. Zudem ist CA-IX bei Prozessen der Zelladhäsion und Proliferation (Kontaktinhibition) in Abhängigkeit des Sauerstoffpartialdrucks beteiligt<sup>[46]</sup>. Auch eine Freisetzung der extrazellulären Domäne von CA-IX konnte beobachtet werden. Bisher ist es noch ungeklärt, inwieweit die Freisetzung der extrazellulären Domäne von CA-IX durch Metalloproteinasen einen Einfluss auf die Tumorprogression hat<sup>[47]</sup>. Dorai *et al.*<sup>[46]</sup> konnte für CA-IX eine Rolle bei dem PI-3-Kinase-vermittelten Signalweg beobachten. Die Bindung von TGF- $\alpha$  an seinen Rezeptor EGF-R (epidermal growth factor receptor) führt zu dessen Autophosphorylierung, wodurch die Kinase-Aktivität des Rezeptors initiiert wird. Dieser wiederum phosphoryliert CA-IX innerhalb der zytoplasmatischen Domäne. CA-IX selber besitzt zwar keine Kinase-Aktivität, stellt aber durch seine Phosphorylierung Bindungsstellen für Adaptermoleküle bereit und trägt somit zu einer Amplifizierung oder Diversifizierung der onkogenen EGF-R-vermittelten Signalgebung bei. CA-IX gilt auch als wichtiger prognostischer Marker für das klarzellige RCC. Eine hohe CA-IX-Expression im mRCC ist mit einer besseren Prognose verknüpft, als eine schwache CA-IX-Expression<sup>[48]</sup>.

## 1.2 EMT

Der Begriff epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) beschreibt eine Reihe von inter- und intrazellulären Prozessen, bei denen Epithelzellen ihre epithelialen Charakteristika verlieren und typische mesenchymale Eigenschaften annehmen. Unter normalen Bedingungen können sich epitheliale Zellen innerhalb der Zellschicht bewegen, wobei Zell-Zell-Kontakte zu Nachbarzellen immer aufrecht erhalten werden, jedoch verlassen sie nie den epithelialen Zellverbund<sup>[49]</sup>. Beim Übergang vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp wird die Polarisierung der Zelle umstrukturiert oder aufgehoben und die für die Zellkontakte verantwortlichen Adhensionsmoleküle werden herunterreguliert, wie z.B. E-Cadherin und Zytokeratine. Gleichzeitig werden mesenchymale Moleküle hochreguliert, wie z.B. Vimentin und N-

Cadherin, wodurch die Zellen einen invasiven migratorischen Phänotyp annehmen<sup>[50]</sup>. Mesenchymale Zellen bilden im Gegensatz zu epithelialen Zellen keine geordneten Zellverbände und besitzen keine Polarisierung der Oberflächenmoleküle und des Aktin-Zytoskeletts. Mit benachbarten Zellen stehen sie nur fokal in Kontakt und nehmen *in vitro* eine spindelförmige, fibroblastenartige Morphologie an<sup>[51]</sup>. Durch die Expression von Extrazellulärmatrix (ECM) -abbauenden



**Abb.3: Schematische Darstellung der EMT.** Aus dem normalen Epithel (A), das durch eine Basalmembran begrenzt ist, kann sich durch unkontrollierte Proliferation ein Adenom (B) bilden, was mit einem Verlust der Zell-Polarität einhergeht. Durch weitere Transformationen entsteht ein Karzinom (C) und es kommt zu einem Verlust von Zellkontakten. Durch das EMT-Transkriptom werden Matrix-Metalloproteinasen exprimiert und die Zellen nehmen einen invasiven migratorischen Phänotyp an (D). Dies befähigt die Zellen zur Wanderung durch die fragmentierte Basalmembran in Blut- oder Lymphgefäße (E), wo sie passiv weiter transportiert werden und an anderen Orten wieder herauswandern, um neue Metastasen zu bilden (F). Dieser Prozess wird als mesenchymale-epitheliale Transition (MET) bezeichnet. Entnommen aus Thiery (2002)<sup>[13]</sup>.

Enzymen, wie Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), sind mesenchymale Zellen während einer EMT fähig, die Basalmembran zu überwinden und in Blutgefäße oder Lymphgefäße einzuwandern, wo sie passiv in entfernte Gewebe gelangen. Durch den umgekehrten Prozess zur EMT, der mesenchymalen-epithelialen Transition (MET), können dort neue Metastasen gebildet werden (Abb.3). Ungefähr 90 % aller Krebsarten entstehen aus epithelialen Strukturen und wiederum ca. 90 % aller Krebstoten gehen auf die Metastasierung des Primärtumors zurück. Somit kann der EMT eine maßgeblich Rolle bei der Tumorprogression zugeschrieben werden<sup>[50]</sup>. Die

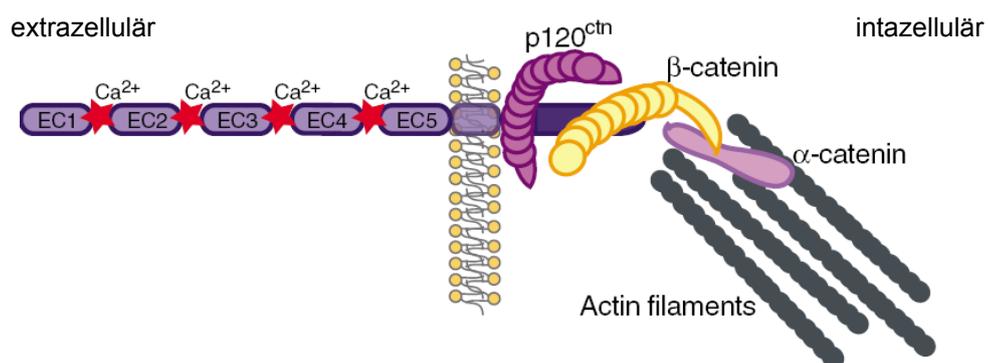
EMT bei der Tumorprogression kann auch als eine Rekapitulation der EMT während der Embryogenese angesehen werden. Ohne eine EMT würden mehrzellige Organismen nicht über das Blastula-Stadium hinaus kommen. Dabei sind migratorische mesenchymale Zellen an einer Neubildung von Organen, wie dem Herzen, der meisten kraniofazialen Strukturen sowie des Skelettmuskel- und des peripheren Nervensystems beteiligt<sup>[13]</sup>. Eine EMT kann auch bei Wundheilungsprozessen beobachtet werden, wie in der fibrotischen Niere, bei der es zu einer Ansammlung von Proteinen der ECM kommt. Diese werden von fibroblastoiden Zellen gebildet, die der Wundheilung dienen und zu einem Drittel lokal aus den tubulären Epithelien der Niere durch eine EMT gebildet werden<sup>[52]</sup>. Auch die der EMT nachfolgenden MET wird während vieler Stadien der Morphogenese beobachtet, wie z.B. bei der Entstehung des Herzens, von Somiten oder der Niere<sup>[13]</sup>.

Eine EMT kann durch eine Vielzahl von extrazellulären Faktoren ausgelöst werden. Dabei enden verschiedene Signalwege an gemeinsamen Endpunkten, die unter anderem zu einer Expression von EMT-assoziierten Genen führen<sup>[51]</sup>. Die Induktion einer EMT ist stark vom zellulären Kontext abhängig und bedarf meist einem Zusammenspiel von extrazellulären Signalen. Eine EMT-induzierende Wirkung wurde z.B. für die ECM-Komponenten Kollagen und Hyaluronsäure nachgewiesen<sup>[53]</sup>. Überwiegend kommen hierfür jedoch lösliche Wachstumsfaktoren aus der TGF- $\beta$ - (transforming growth factor  $\beta$ ), IGF- (insulin-like growth factor) und FGF- (fibroblast growth factor) Familie, sowie EGF (epidermal growth factor) und HGF (hepatocyte growth factor) in Frage (siehe 1.2.3), die von Stromazellen oder den Tumorzellen selbst produziert werden. Die Aktivierung der Rezeptor-vermittelten Signalwege durch die genannten Wachstumsfaktoren führt zur Aktivierung von intrazellulären Effektormolekülen, durch die verschiedene Stadien der EMT-induziert werden können<sup>[50]</sup>, auf die im weiteren genauer eingegangen werden soll.

### 1.2.1 Der Cadherin-Switch

Zell-Zell-Kontakte dienen innerhalb eines Zellverbandes zur Aufrechterhaltung der geordneten Strukturen und zur Kommunikation innerhalb von Zellen. Zudem ermöglichen sie zwischen Epithelzellen eine Abgrenzung zu benachbarten Kompartimenten. Bei der Ausbildung von Zellkontakten sind verschiedene transmembrane Adhisionsmoleküle beteiligt, die zu einer Polarisierung der Zelle führen. Die so genannten „Tight Junctions“ werden von Oberflächenproteinen, wie Occludin und Claudin, gebildet, die intrazellulär durch z.B. das Zona occludens Protein-1 (ZO-1) mit dem Aktingerüst verbunden werden. Durch „Tight Junctions“ wird zum einen der parazelluläre Transport limitiert, indem die Zelle in diesem

Bereich „abgedichtet“ wird, und zum anderen durch die apikale (dem Außenmilieu zugewandte) Anordnung eine Polarisation der Zelle erreicht, die einen Austausch von Membrankomponenten zwischen apikalen und basolateralen Bereichen durch Diffusion verhindert<sup>[54,55]</sup>. In basaler Orientierung zu den „Tight Junctions“ befinden sich „Adherens Junctions“, die homodimere Zell-Zell-Kontakte über klassische  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Cadherine vermitteln. Zu den bekanntesten und bedeutendsten Cadherinen bei der EMT zählen das epitheliale Cadherin (E-Cadherin) und das neuronale Cadherin (N-Cadherin) aus der Typ I-Cadherin-Familie<sup>[13,56]</sup>. Diese besitzen fünf extrazelluläre Immunglobulin (Ig) -Domänen, eine Transmembran- und eine intrazelluläre Domäne. Die Bindung kommt durch homophile Interaktion von einer bis mehreren Ig-Domänen zustande. Innerhalb einer stark phosphorylierten Region der intrazellulären Domäne bindet  $\beta$ -Catenin an das Cadherin. Über  $\alpha$ -Catenin und Vinculin oder Plakoglobin wird dieser Komplex mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden, wobei  $\alpha$ -Catenin Monomere eher an den Cadherin-Catenin-Komplex binden und  $\alpha$ -Catenin Dimere an das Aktin-Zytoskelett<sup>[57]</sup>.



**Abb.4: Cadherin-Adhensions-Komplex.** Die fünf homologen extrazellulären „Cadherin-Repeats“ (EC1-5) werden  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig gebildet und zusammengehalten. An die zytoplasmatische Domäne bindet nahe der Plasmamembran das stabilisierende p120-Catenin ( $\text{p120}^{\text{ctn}}$ ) und nahe dem C-Terminus  $\beta$ -Catenin.  $\alpha$ -Catenin bindet an  $\beta$ -Catenin und verbindet den Adhensionskomplex mit dem Aktin-Zytoskelett. E-Cadherin und N-Cadherin sind sich in diesem Aufbau ähnlich. Entnommen und modifiziert aus Wheelock *et al.* (2008)<sup>[11]</sup>.

Eine weitere Form von Zell-Zell-Kontakten bilden die Desmosomen. Sie dienen hauptsächlich der Gewebestabilität, indem sie Spannungs- und Scherkräfte verteilen. Dabei sind Desmocolline und Desmogleine miteinander verbunden und über Plakoglobin und Desmoplakin mit Keratinfasern verknüpft<sup>[56,58]</sup>.

E-Cadherin nimmt als Ordnungshüter des epithelialen Phänotyps in Epithelzellen sowohl während der Embryogenese als auch in der Tumourprogression eine Schlüsselrolle ein. Ein Verlust oder eine verminderte Expression oder Funktion von E-Cadherin wurde in vielen Karzinomen beobachtet und in Verbindung mit der Induktion einer EMT gebracht<sup>[59]</sup>. Der so genannte Cadherin-Switch, bei dem üblicherweise von einem Wechsel der E-Cadherin- auf eine N-Cadherin-Expression

gesprochen wird, nimmt innerhalb der EMT eine Schlüsselrolle ein<sup>[11,60,61]</sup>. Für die N-Cadherin-Expression wurde eine wichtige Funktion bei der Zellmigration, Tumorinvasion und Metastasierung beobachtet<sup>[62,63]</sup>. Für den Verlust von E-Cadherin wurden mehrere Mechanismen nachgewiesen. Als eine Möglichkeit wurden Mutationen im E-Cadherin-Gen beschrieben, die zu einer reduzierten Adhäsion oder zum Verlust der Adhäsionsfähigkeit führten<sup>[64]</sup>. Als weitere Möglichkeit wurde auf epigenetischer Ebene eine Modifikation des E-Cadherin-Promotors gezeigt. Durch dessen Hypermethylierung wurde eine Herunterregulierung bzw. Stilllegung der E-Cadherin-Expression im RCC gefunden<sup>[65]</sup>. Neben den selten beschriebenen Mutationen im E-Cadherin-Gen wurde auch eine Kombination aus beiden Möglichkeiten beschrieben. Dabei war folglich ein Allel mutiert und das andere durch Promotor-Methylierung inaktiviert. Eine indirekte Fehlregulation von E-Cadherin wurde über Mutationen im  $\beta$ -Catenin und  $\alpha$ -Catenin-Gen gefunden<sup>[66]</sup>. Freies  $\beta$ -Catenin, das nicht im Adhäsionskomplex gebunden ist, spielt im Wnt-Signalweg eine Rolle und kann in diesem Zusammenhang über die Bindung mit Transkriptionsfaktoren der Lef/Tcf-Familie Zielgene im Zellkern aktivieren<sup>[67]</sup>. Auch auf posttranskriptioneller Ebene wurde eine E-Cadherin-Regulation beobachtet. Die Aktivierung von v-Src, einer Rous Sarcoma-Virus Tyrosinkinase, führte in MDCK-Zellen zu einer Phosphorylierung von E-Cadherin, gefolgt von einer Ubiquitinierung durch die E3-Ubiquitin-Ligase Hakai<sup>[68]</sup>, wodurch es zur Endozytose von E-Cadherin durch Rab-GTPasen kam. Anstatt auf dem regulären Weg wieder an die Plasmamembran zurücktransportiert zu werden, wurde E-Cadherin durch Src-Aktivierung oder auch durch HGF in Lysosomen abgebaut<sup>[69]</sup>. Zudem wurde ein membranständiges Glykoprotein entdeckt, namens Dysadherin, das ebenfalls auf posttranskriptioneller Ebene die E-Cadherin-Expression in einigen Tumoren herunterregulieren konnte und oder dessen Verknüpfung mit dem Aktin-Zytoskelett einschränkte<sup>[70,71]</sup>.

Eine immer besser verstandene Möglichkeit, die E-Cadherin-Expression herunterzuregulieren, besteht in der Repression von E-Cadherin durch Transkriptionsfaktoren, die spezifisch an die E-Boxen des proximalen E-Cadherin-Promotors binden<sup>[72]</sup>. Dazu zählen Transkriptionsfaktoren aus der Zink-Finger-Protein-Familie Slug/Snail, wie Snai1 und Snai2, Twist,  $\delta$ EF1, SIP1 (Smad-interacting protein 1) und der basische Helix-Loop-Helix Faktor E12/E47 (TCF3)<sup>[73-78]</sup>. Twist hat neben der E-Cadherin-Repressor-Funktion noch zusätzlich eine direkt aktivierende Funktion auf die N-Cadherin-Expression<sup>[79,80]</sup>. Für Snai1 konnte die genaue Repressor-Funktionsweise bereits aufgeklärt werden. Durch die Interaktion von Snai1 mit den Histon Deazetylasen 1 (HDAC1) und HDAC2 und dem Korepressor mSin3A werden die Histone H3 und H4 des E-Cadherin-Promotors deazetyliert, was die Bindung der RNA-Polymerase II an den Promotor verhindert<sup>[81]</sup>. Tatsächlich sind einige der E-Cadherin-Repressoren an einer EMT während der

Embryogenese beteiligt, wie z.B. bei der Wanderung von Zellen der Neuralleiste<sup>[82]</sup>, oder konnten *in vitro* eine EMT induzieren<sup>[78,83]</sup>.

Interessanterweise konnte eine Regulation einiger E-Cadherin-Repressoren durch Hypoxie-regulierte Gene, wie HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , VHL und CA-IX, beobachtet werden. In HIF-1 $\alpha$  abhängiger Weise wurde z.B. eine mRNA-Expression der E-Cadherin-Repressoren E12/E47,  $\delta$ EF1 und SIP1 beschrieben, die zur Herunterregulierung von E-Cadherin führte<sup>[8,84]</sup>. Dennoch wurde von Estaban *et al.*<sup>[84]</sup> gezeigt, dass HIF-2 $\alpha$  mehr an einer Herunterregulierung von E-Cadherin beteiligt ist, als HIF-1 $\alpha$ . Evans *et al.*<sup>[9]</sup> konnte dies bekräftigen, indem er eine E-Cadherin-Reexpression in der VHL- und HIF-1 $\alpha$ -defizienten Nieren-Adenokarzinom-Zelllinie (klarzelligen Ursprungs) 786-O durch die Rekonstitution von funktionellem VHL-Protein zeigte. Die damit verbundene HIF-2 $\alpha$  Degradation durch VHL führte zu einer verminderten Snai1- und SIP1-Expression, nicht jedoch bei Snai2,  $\delta$ EF1 und E12/E47.

Eine direkte Korrelation zwischen der E-Cadherin- und VHL-Expression wurde in Abhängigkeit der Zelldichte bei RPTEC (renal proximal tubular epithelial cells) beobachtet. So stieg die VHL-Proteinexpression in einer dicht gewachsenen Kultur im Vergleich zu vereinzelt gewachsenen Zellen um das 100-fache an, was gleichzeitig zu einem VHL-vermittelten Wachstumsstillstand durch Kontaktinhibition führte<sup>[85]</sup>. Parallel wurde ein Anstieg der E-Cadherin-Expression beobachtet<sup>[9]</sup>. In vereinzelt gewachsenen Zellen konnte auch eine erhöhte HIF-2 $\alpha$ -Expression nachgewiesen werden, die bei Erreichen der Konfluenz und somit einer erhöhten VHL-Expression verschwand oder zurückging<sup>[86]</sup>.

Auch CA-IX ist bei der Zelladhäsion beteiligt. Durch Überexpression von CA-IX in MDCK-Zellen, einer epithelialen Tumorzelllinie, die aus den distalen Nierentubuli eines Hundes gewonnen wurde, konnte unter Hypoxiebedingungen eine Translokation von E-Cadherin und CA-IX ins Zytoplasma beobachtet werden. Unter Normoxie-Bedingungen bildete sich der Ursprungszustand zurück, nämlich eine membranständige Kolokalisation von E-Cadherin und CA-IX. Des Weiteren konnte eine verminderte Bindungsstärke von CA-IX-exprimierenden MDCK-Zellen beobachtet werden. In einem Kopräzipitations-Experiment wurde eine Assoziation von CA-IX mit  $\beta$ -Catenin nachgewiesen. Dies lässt vermuten, dass die Regulation von E-Cadherin durch CA-IX über  $\beta$ -Catenin vermittelt wird<sup>[87]</sup>.

Auf der anderen Seite wurden auch Faktoren gefunden, die eine E-Cadherin-Expression induzieren können. An dieser Stelle soll nur der Transkriptionsfaktor WT1 aus der Zink-Finger-Protein-Familie erwähnt werden, der bei der MET in der Embryogenese der Nieren beteiligt ist. Neben vielfältigen weiteren Funktionen wurde WT1 als Transaktivator des E-Cadherin-Promotors charakterisiert<sup>[88]</sup>.

## 1.2.2 Zytoskelett-Umstrukturierung und Migration

Während bei polarisierten Epithelzellen die Adhensionskomplexe über intrazelluläre kortikale Aktinfasern verbunden sind, liegt das Aktin in mesenchymalen Zellen in Form von Filopodien, Lamellopodien und Aktin-Stressfasern vor, die den migratorischen Phänotyp ermöglichen. Filopodien bestehen aus dicht gebündelten Aktinfasern, die zur Reiz-zugewandten Seite zylinderförmig ausgerichtet sind. Auch Lamellopodien sind zur Vorderseite der Zelle hin ausgerichtet, wobei es sich hier um dünne, blattartige Netzwerke handelt, die die Vorwärtsbewegung der Zelle initiieren. Aktin-Stressfasern wiederum bestehen aus kurzen, den Zellkörper durchspannende Aktin-Bündel mit eingelagerten Myosinfilamenten, durch deren Kontraktion sich die Zelle vorwärts bewegen kann<sup>[89]</sup>. Bevor sich jedoch eine Zelle von der Basallamina entfernen kann, die überwiegend aus Kollagen IV, Laminin und Nidogen zusammengesetzt ist und an die die Zelle über Hemidesmosomen verankert ist, müssen Bestandteile der ECM proteolytisch durch MMPs abgebaut werden. Die MMPs bezeichnet eine Familie substratspezifischer Endopeptidasen unterschiedlicher Struktur, denen ein ionisiertes Zinkatom im aktiven Zentrum gemeinsam ist. MMP-2 und MMP-9, auch Gelatinase A bzw. B genannt, kommen bei der Tumorprogression eine besondere Rolle zu, da sie neben Gelatin und Laminin V die Kollagen-Typen I, IV, V und X abbauen können und somit der Zelle einen Weg durch die Basallamina bahnen können<sup>[90]</sup>. Eine Aktivierung von MMPs findet durch verschiedene Proteasen statt, wie z.B. Plasmin und die Plasminogenaktivatoren vom Urokinase- bzw. Gewebe-Typ (uPa bzw. tPA)<sup>[91]</sup>. tPA ist für die intravaskuläre Fibrinolyse zuständig und uPA für die zellvermittelte Proteolyse bei der Makrophageninvasion, Wundheilung, Embryogenese, Invasion und Metastasierung<sup>[92]</sup>. Auch andere MMPs, wie die membrangebundene MT1-MMP, kann z.B. das Pro-MMP-2-Peptid in seine aktive Form spalten, gefolgt und vervollständigt durch die Autoaktivierung<sup>[93]</sup>. In letzter Zeit wurde deutlich, dass die Funktion von MMPs nicht nur auf die ECM-Modellierung beschränkt ist, sondern ein weit größeres Spektrum umfasst. Demnach sind MMPs an der Prozessierung von Proteinen beteiligt, die bei der Proliferation, Apoptose, Migration und bei Entzündungen eine Rolle spielen<sup>[94]</sup>. Dazu gehören Chemokine, Adhensionsmoleküle, Wachstumsfaktor-Bindeproteine und membrangebundene Vorläuferformen von Wachstumsfaktoren und Zytokinen sowie deren Rezeptoren. Dennoch werden ADAM (a disintegrin and metalloprotease) -Proteine als die eigentlichen „Shedding“-Mediatoren betrachtet<sup>[95]</sup>.

Auf den wechselseitigen Einfluss von MMPs und Adhensionsmolekülen kommt es bei der Invasion von Zellen besonders an. Es konnte gezeigt werden, dass MMP-3 und MMP-7 den extrazellulären Teil von E-Cadherin zu einem löslichen Fragment (80 kDa) abbauen können, der auf parakrine Weise die E-Cadherin-Kontakte inhibieren

kann<sup>[96]</sup>. Zudem wurde eine Expressionssteigerung von MT1-MMP, MMP-2 und MMP-9 durch das 80 kDa E-Cadherin-Fragment beobachtet, wodurch das invasive Potential der Zelle gesteigert wurde<sup>[97]</sup>. Dagegen konnte das vollständige 120 kDa E-Cadherin-Fragment die Expression von MMP-1, -3, -9 und MT1-MMP vermindern und die Aktivität von MMP-2 reduzieren<sup>[98]</sup>. Obwohl MMP-9 E-Cadherin nicht proteolytisch verdauen kann, wurde dennoch eine Funktionseinschränkung von E-Cadherin durch eine verstärkte MMP-9-Expression beobachtet<sup>[99]</sup>. Auch der E-Cadherin-Repressor Snai1 kann über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Ets-1 die Genexpression von MMP-2 und MMP-9 aktivieren<sup>[100]</sup>. Snai1 wiederum kann selbst durch MMPs reguliert werden. Radisky *et al.*<sup>[101]</sup> konnte durch MMP-3-Stimulation von murinen Mammakarzinomzellen *in vitro* eine EMT induzieren. Durch die MMP-3-Stimulation wurde eine alternative Spleißvariante der kleinen GTPase Rac1 exprimiert (Rac1b), durch die reaktive Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxxygen species) in Mitochondrien gebildet wurden, was neben einer genetischen Instabilität zur Aktivierung von Snai1 führte.

Die Aktivität von MMPs und uPA wird durch spezifische Inhibitoren kontrolliert. Für MMPs sind bisher die vier Gewebe-Inhibitoren TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase) -1, -2, -3 und -4 bekannt und für uPa wurden PAI-1 und PAI-2 als Inhibitoren gefunden. Obwohl durch die Expression dieser Inhibitoren oft eine Inhibition der Invasion, Metastasierung und des Tumorwachstums beobachtet werden konnte, haben TIMPs, besonders TIMP-1 und TIMP-2 eine tumorfördernde Wirkung. So wurde diesen eine wachstumsfördernde Eigenschaft in einer Reihe von Zelltypen, inklusive Fibroblasten, zugeschrieben. Zudem schützen TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-4 die Zellen vor Apoptose. TIMP-3 dagegen hat eine pro-apoptotische Funktion<sup>[102]</sup>. Die teilweise kontroverse Multifunktionalität von TIMPs wird auch an TIMP-2 deutlich. Einerseits hat TIMP-2 einen inhibitorischen Einfluss auf MMP-2, ist aber gleichzeitig zusammen mit MT1-MMP für die Aktivierung der Vorläuferform von MMP-2 (Pro-MMP-2) verantwortlich<sup>[103]</sup>. Wie bei vielen anderen Prozessen sind diese unterschiedlichen Funktionen konzentrationsabhängig, wobei bei hohen Konzentrationen von TIMP-2 die inhibierende Effektorfunktion zum Tragen kommt<sup>[104]</sup>. Ähnliches wurde für PAI-1 gefunden. Bei physiologischen Konzentrationen fördert PAI-1 die Angiogenese und Tumordinvasion, bei erhöhter Konzentration hingegen hemmt es die Angiogenese<sup>[105]</sup>. Duffy *et al.*<sup>[95]</sup> vermutete, dass Protease-Inhibitoren, wie PAI-1, TIMP-1 und TIMP-2, eher die Tumorprogression fördern als hemmen. Unterstützt wird diese Vermutung durch verschiedene Studien, die eine erhöhte PAI-1<sup>[106]</sup> oder TIMP-1<sup>[107-109]</sup>-Expression mit einer schlechten Prognose in Verbindung brachten. Andererseits wird auch das Ungleichgewicht bei der Expression von MMPs und ihren spezifischen Inhibitoren als ein Indikator für die Aggressivität von Tumorzellen angesehen. Demnach deuten eine hohe Mikrovesikel-Dichte und eine Überexpression von MMP-9 und MMP-2 oder

eine Herunterregulierung von E-Cadherin im Primärtumor auf ein erhöhtes Potential zur Metastasierung hin<sup>[110]</sup>.

Für eine erfolgreiche Metastasierung müssen Zellen, die in das Blutgefäß- oder Lymphgefäßsystem einwandern konnten, auch wieder an einem anderen Ort herauswandern. Dabei ist die Einwanderung in die Gefäße der limitierende Schritt<sup>[111]</sup>. Proteolytische Aktivität, zumindest von MMPs, spielen bei der Extravasation eine untergeordnete Rolle, wie in einem Modellsystem mit TIMP-1-überexprimierenden Zellen gezeigt wurde. Jedoch bildeten diese Zellen weniger und kleinere Metastasen als TIMP-1-untransfizierte Zellen, was auf eine fehlende MMP-abhängige Aktivierung von Wachstumsfaktoren sowie von angiogenen Faktoren schließen lässt<sup>[112]</sup>.

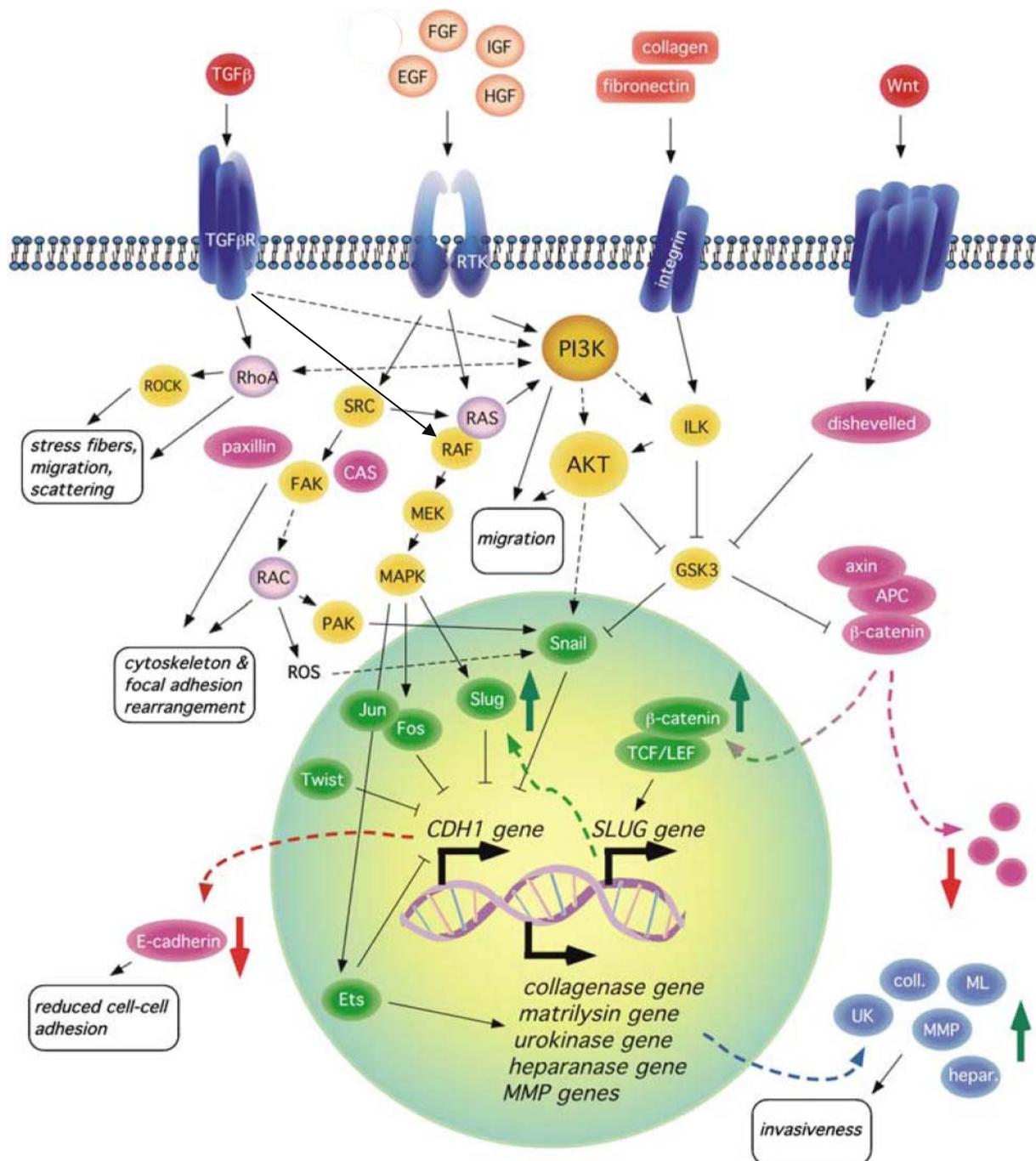
Die Wanderung von metastasierenden Tumorzellen in das Zielgewebe ist kein zufälliger Prozess, sondern findet in einer Vielzahl von Tumoren über gerichtete chemotaktische Signale statt, wie über den Chemokinrezeptor CXCR4 und dessen Liganden CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ; stromal derived factor 1)<sup>[113]</sup>. Der CXCR4/CXCL12-Signalweg ist unter physiologischen Bedingungen für die gerichtete Wanderung von Lymphozyten bei Entzündungsprozessen wichtig, sowie bei der Wanderung von hämatopoetischen Vorläuferzellen und bei der B-Zell-Entwicklung<sup>[114-116]</sup>. Die Expression von CXCR4 dient, wie in einigen anderen Tumoren, als prognostischer Marker im ccRCC und ist mit einer schlechten Überlebensrate verbunden<sup>[117]</sup>. Bei Patienten mit mRCC exprimierten über 90 % der zirkulierenden Cytokeratin-positiven Zellen CXCR4. Ein Zusammenhang zwischen der CXCR4-Expression von metastasierenden RCC-Zellen und der Expression von CXCL12 im Zielgewebe konnte in einem Maus-Modell gezeigt werden<sup>[118]</sup>. Die Expression von CXCR4 und CXCL12 wird im ccRCC durch HIF-1 $\alpha$  reguliert<sup>[119]</sup>. Staller *et al.*<sup>[117]</sup> zeigte eine erhöhte CXCR4-Expression durch den Verlust des VHL-Gens. Des Weiteren wurde eine Korrelation zwischen der Expression von MMPs und CXCR4 gefunden. Bei einer hohen mRNA-Expression von CXCR4 wurde parallel eine hohe Expression von MMP-2 und MMP-9 in VHL-abhängiger Weise bei RCC-Primärtumoren beobachtet. In einer weiteren immunhistochemischen Untersuchung von 380 RCC-Primärtumoren wurde in 74 % der Fälle eine Koexpression von CXCR4 und MMP-2 gefunden. Somit spielt der Verlust von VHL für die migratorische Fähigkeit von Tumorzellen innerhalb der Tumorprogression eine wichtige Rolle. Eine Koexpression von CXCR4 und CXCL12 im Primärtumor kann als auto- und parakrine Aktivierung der Tumorzellen angesehen werden<sup>[119]</sup>.

### 1.2.3 EMT-induzierende Wachstumsfaktoren und extrazelluläre Signale

Wie bereits beschrieben, wurde für einige Wachstumsfaktoren eine EMT-induzierende Wirkung gefunden (siehe 1.2). Dies wurde zum ersten Mal entdeckt, als Epithelzellen mit konditioniertem Medium von Fibroblasten kultiviert wurden. Dabei vereinzelt sich die Zellen und nahmen einen migratorischen mesenchymalen Phänotyp an<sup>[120]</sup>. Der dafür zuständige Faktor wurde als „Scatter Factor“ (SF) bezeichnet und später als HGF identifiziert<sup>[121]</sup>. Der Rezeptor für HGF ist die Tyrosin-Kinase Met. Die Bindung von HGF an c-Met reguliert das Wachstum, die Migration und Invasion von Tumorzellen und spielt während der Embryogenese, wie bei der verzweigten Morphogenese (branching morphogenesis), eine Rolle<sup>[122]</sup>. Ein invasives Potential von RCC-Zelllinien nach HGF-Stimulation konnte jedoch nur bei VHL-defizienten Zellen beobachtet werden. VHL scheint somit eine tumorsuppressive Funktion auch auf den Met-vermittelten Signalweg auszuüben<sup>[123]</sup>. Peruzzi *et al.*<sup>[124]</sup> konnte dabei zeigen, dass eine HGF-vermittelte  $\beta$ -Catenin-Phosphorylierung durch funktionelles VHL unterdrückt werden kann, was ohne VHL-Aktivität zur Auflösung von „Adherens Junctions“ führt und eine nukleäre Akkumulation von  $\beta$ -Catenin zur Folge hat. In Zusammenhang mit einem hypoxischem Tumormilieu und dem Verlust von VHL konnte eine Induktion der c-Met-Expression beobachtet werden, die zu einer Verstärkung des HGF-Signals führte und die Zellen für HGF empfindlicher machte. Dies führte zu einem invasiven Potential der Tumorzellen<sup>[125]</sup>.

Weitere multifunktionelle Zytokine, die eine EMT induzieren können, sind Mitglieder der TGF- $\beta$ -Familie, wie TGF- $\beta$ 1<sup>[126]</sup>, TGF- $\beta$ 2<sup>[127]</sup> und TGF- $\beta$ 3<sup>[128]</sup>. TGF- $\beta$ 1 ist an der Regulation der Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt. Auf die Tumorprogression hat es eine ambivalente Wirkung. Während es auf untransformierte Zellen und in der Anfangsphase der Tumorprogression inhibierend wirkt, indem es Apoptose und Wachstumsstillstand induziert, fördert es im fortgeschrittenen Tumorstadium eine EMT sowie eine Tumordinvasion und Metastasierung<sup>[50]</sup>. Durch die Bindung von TGF- $\beta$ -Dimeren an den TGF- $\beta$ -Rezeptor vom Typ II (T $\beta$ RII) wird eine Assoziation mit dem T $\beta$ RI initiiert, wodurch über eine Konformationsänderung die Kinase-Domänen aktiviert werden. Über diese werden eine Reihe von MAPK (mitogen activated protein kinase) -Signalwegen aktiviert, wie ERKs (extracellular signal-regulated kinases), JNKs (c-Jun N-terminal kinases) und p38 MAPK<sup>[129]</sup>. Ein TGF- $\beta$ -induziertes invasives Potential ist *in vivo* an den Raf/MEK/ERK-Signalweg gekoppelt<sup>[130]</sup>. Es scheint aber auch ein Zusammenspiel mit anderen Signalwegen wichtig zu sein<sup>[131]</sup>. TGF- $\beta$ 1 wird unter anderem durch VHL reguliert, indem es die Halbwertszeit der mRNA von TGF- $\beta$ 1 verringert. Somit kommt es bei einer VHL-Inaktivierung zu einer erhöhten TGF- $\beta$ 1-Expression, wie sie bei vielen RCC-Patienten beobachtet wurde<sup>[132,133]</sup>. Patienten mit mRCC hatten sogar durchschnittlich eine doppelt so hohe TGF- $\beta$ 1-Plasma-Konzentration wie lokal

begrenzte Tumoren<sup>[134]</sup>. Dennoch ist eine TGF- $\beta$ -induzierte EMT zumindest *in vitro* ein seltener Mechanismus<sup>[135]</sup> und bedarf *in vivo* eines autokrinen TGF- $\beta$ -Signals, meist in Kombination mit einem anderen onkogenen Signalweg, wie dem Ras-Signalweg, um dem mesenchymalen Phänotyp aufrecht zu erhalten<sup>[90]</sup>. Durch die kombinierte Stimulation von proximalen tubulären Nierenepithelzellen mit TGF- $\beta$  und FGF-2 konnte eine EMT *in vitro* beobachtet werden. Durch die Stimulation von TGF- $\beta$ , FGF-2 oder EGF alleine wurde lediglich eine teilweise EMT festgestellt.



**Abb.5: Vereinfachte Darstellung verschiedener Signalwege, die zu einem invasiven migratorischen Phänotyp führen können.** Endstationen von Signalwegen sind eingerahmt dargestellt. Beschreibung siehe Text. Entnommen und modifiziert aus Larue und Bellacosa (2005)<sup>[12]</sup>.

Zudem konnte bei allen untersuchten Wachstumsfaktoren nach Einzelstimulation eine Vimentin-Expression erreicht werden, jedoch waren nur TGF- $\beta$  und FGF-2 in der Lage, die E-Cadherin- und Zytokeratin-Expression herunterzuregulieren. Zudem konnte allein durch FGF-2-Stimulation eine erhöhte MMP-2- und MMP-9-Expression erreicht werden<sup>[136]</sup>. Dennoch fand Li *et al.*<sup>[137]</sup> auch eine erhöhte MMP-2-Expression nach TGF- $\beta$ -Stimulation von tubulären Nierenepithelzellen. Darüber hinaus war ein transformierender Effekt durch TGF- $\beta$  von der ILK (integrin-linked kinase) abhängig. Während der Embryogenese oder der Tumorprogression sind FGF-2 und IGF-II fähig, eine EMT *in vivo* zu induzieren<sup>[138-140]</sup>. Die Bindung des multifunktionellen Zytokins FGF-2 an die Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) FGFR (fibroblast growth factor receptor) reguliert unter physiologischen Bedingungen wie viele andere Zytokine das Wachstum und Überleben sowie die Differenzierung und Migration in einer Reihe von Zellen<sup>[141,142]</sup>. IGF-II wird von einigen Tumoren exprimiert und wirkt, ähnlich wie Insulin, als starker Wachstumsfaktor. Die Signaltransduktion wird über die RTK IGFR (insulin-like growth factor receptor) vermittelt<sup>[143]</sup>.

Bei der EMT ist ein breites Spektrum an Transkriptionsfaktoren beteiligt. Einige davon können durch Wachstumsfaktoren reguliert werden. Snai1, Snai2 und SIP1 können je nach Zelltyp durch TGF- $\beta$  über den Smad-Signalweg induziert werden, wobei die Snai1- und Snai2-Expression sich in tubulären Nierenepithelzellen gegenseitig ausschließen<sup>[144,145]</sup>.

Für einige Zytokine wurde auch eine indirekte Repressor-Funktion für E-Cadherin durch Mikroarray-Analysen von Epithelzellen gefunden. Dabei wurden ID2 (inhibitor of differentiation 2) und ID3 als Zielstrukturen von TGF- $\beta$  und BMP7 (bone morphogenetic protein 7) identifiziert. ID-Proteine blockieren im Normalzustand die Aktivität von E2A, dem Genprodukt von E12/E47, durch Dimerisierung. Da TGF- $\beta$  die Expression von ID2 hemmt, wird E2A aktiv und kann als E-Cadherin-Repressor fungieren<sup>[146]</sup>. BMP7 dagegen verhält sich antagonistisch zu TGF- $\beta$ , was die Epithelzellen vor einer Transformation schützt<sup>[147]</sup>. Zeisberg *et al.*<sup>[148]</sup> konnte zudem zeigen, dass sich eine TGF- $\beta$ 1-induzierte EMT in RPTEC durch BMP7 revertieren lässt.

EGF sowie TGF- $\alpha$  binden an die RTK EGFR (epidermal growth factor receptor), dessen Signaltransduktion in vielen Zellen einen Einfluss auf das Wachstum hat<sup>[149]</sup>. Auf posttranskriptioneller Ebene wurde EGF eine Rolle bei der nukleären Akkumulierung von Snai1 zugeschrieben. Snai1 hat mehrere funktionelle Phosphorylierungsstellen. Die Phosphorylierung durch GSK3 $\beta$  (glycogen-synthase kinase-3 $\beta$ ) führt zum nukleären Export und anschließender Ubiquitinierung von Snai1, während eine EGF-induzierte Phosphorylierung an einem anderen Serin-Rest durch die PAK1 (p21-activated kinase 1) zur Stabilisierung von Snai1 führt. GSK3 $\beta$  ist Teil eines Inhibierungskomplexes von  $\beta$ -Catenin in Abwesenheit eines Wnt-Signals<sup>[150]</sup>.

RTKs sind nicht alleine an einer Signalweiterleitung von extrazellulären Signalen beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass dabei auch Integrine eine Rolle spielen. Integrine sind heterodimere Transmembranrezeptoren, bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, durch deren Kombination verschiedene Subtypen gebildet werden. Sie verknüpfen das intrazelluläre Aktin-Zytoskelett einer Zelle mit Komponenten der ECM, wie Fibronectin, Vitronectin, Laminin und Kollagen. Die Bindung dieser Liganden aktiviert Integrine, was wiederum intrazelluläre Signalkaskaden induziert, die einen Einfluss auf das Wachstum und das Überleben einer Zelle haben sowie auf deren Polarisierung, Differenzierung und Migrationspotential<sup>[50,151]</sup>.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Induktion einer EMT durch extrazelluläre Signale zell- und modellspezifisch ist und stark vom jeweiligen Kontext abhängt<sup>[12]</sup>.

### **1.3 Angeborene und adaptive Immunität im RCC**

Das Immunsystem stellt durch das Zusammenspiel von komplexen Netzwerken einen Abwehrmechanismus des Körpers gegen Eindringlinge wie Viren, Bakterien und andere Krankheitserreger dar. Zudem ist es für die Eliminierung von entarteten körpereigenen Zellen wie Tumorzellen verantwortlich. Dabei spielen sowohl die unspezifische, angeborene Immunantwort, sowie die spezifische adaptive Immunantwort eine Rolle. Die angeborene Immunität wird über das Komplementsystem, Granulozyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Zytokine vermittelt. Für die adaptive Immunität sind Antigen-präsentierende Zellen, wie Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen (DCs), und zytotoxische Effektorzellen, wie B- und T-Zellen, zuständig. Im RCC wird in der Regel ein ausgeprägtes Lymphozyteninfiltrat beobachtet, das neben Lymphozyten, darunter hauptsächlich T-Zellen, NK-Zellen und wenige B-Zellen, auch Monozyten und DCs beinhaltet<sup>[152-155]</sup>. Meist wurde ein höheres Verhältnis von CD8<sup>+</sup>- zu CD4<sup>+</sup>-T-Zellen berichtet<sup>[153,156]</sup>.

Die zytotoxische Aktivität von NK- und T-Zellen unterscheidet sich grundlegend. Während zytotoxische T-Zellen nur Zellen lysieren, die nicht-eigene Peptid/MHC-Komplexe auf der Oberfläche präsentieren<sup>[157]</sup>, lysieren NK-Zellen dagegen entsprechend der „Missing-Self-Hypothese“ nur die Zellen, die eine reduzierte Expression von Peptid/MHC-Komplexen aufweisen<sup>[158]</sup>. Isolierte man die Tumorf infiltrierenden Lymphozyten (TILs) aus RCC-Primärtumoren oder aus RCC-Metastasen, zeigten sich zwei verschiedene zytotoxische Aktivitäten gegen Tumorzellen. Sowohl eine MHC (major histocompatibility complex) -nicht-restringierte als auch eine MHC-restringierte zytotoxische Lyse von Tumorzellen wurden

beobachtet. Bei den MHC-restringierten Effektorzellen handelte es sich hauptsächlich um CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die eine spezifische Lyse von autologen Tumorzellen vermittelten, oder von allogenen Tumorzellen, die über den identischen Tumorpeptid/MHC-Komplex verfügten. Die MHC-nicht-restringierten Effektorzellen lysierten autologe und allogene Tumorzellen sowie die korrespondierenden nicht-tumorösen Nierenzellen<sup>[152]</sup>. Diese breite Spezifität wurde für die meisten TILs von RCC-Patienten gefunden<sup>[159]</sup>. Eine ähnliche Spezifität erreichte man, wenn periphere Blutlymphozyten (PBLs) von RCC-Patienten *in vitro* mit einer hohen IL-2-Konzentration kultiviert wurden. Diese Zellen wurden als LAK (Lymphokine-activated killer) -Zellen bezeichnet<sup>[160]</sup>. LAK-Zellen mit ähnlicher Spezifität gegen Tumorzellen können auch aus PBLs von gesunden Spendern generiert werden. Die Phänotypisierung von LAK-Zellen ergab eine Mischung aus CD3<sup>-</sup>-NK-Zellen und CD3<sup>+</sup>-T-Zellen, wobei die CD3<sup>-</sup>-NK-Zell-Population das stärkste lytische Potential zeigte. Schleypen *et al.*<sup>[161]</sup> konnte zeigen, dass NK-Zellen von frisch isolierten TILs aus verschiedenen RCC-Geweben nach kurzer IL-2-Aktivierung ihre zytotoxische Aktivität zurückerlangten und diese auch die Hauptpopulation von zytotoxischen Effektorzellen bildeten. Die CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Population der LAK-Zellen zeigte ein ähnliches MHC-nicht-restringiertes lytisches Potential wie NK-Zellen sowie in einigen Fällen die CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>-Population<sup>[152]</sup>. Die CD3<sup>+</sup>-Zellen repräsentierten mit >95 % der LAK-Zellen die größte Population, darunter etwa gleich viele CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen<sup>[162]</sup>.

Eine effektive Immunantwort gegen den Tumor ist möglich, wird aber durch verschiedene Mechanismen des Tumors und des Tumormilieus unterdrückt. Häufig auftretende Veränderungen, die das Erkennen und Eliminieren der Tumorzellen durch Zellen des Immunsystems erschweren, sind z.B. Verlust oder Herunterregulierung der Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen, die für die Erkennung durch T-Zellen entscheidend sind, Mutation oder Herunterregulierung von tumorassoziierten Antigenen (TAA), fehlende Expression von kostimulatorischen Signalen oder die Sekretion von Zytokinen, wie TGF- $\beta$  und IL-10, die Immunzellen inhibieren<sup>[163]</sup>. Auch eine veränderte bzw. erhöhte Expression von inhibitorischen Rezeptoren auf TILs gegenüber peripheren Lymphozyten könnte zum Versagen einer effektiven Immunantwort beitragen<sup>[161]</sup>. T- und NK-Zellen tragen zwei strukturell verschiedene Gruppen von inhibitorischen Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Zum einen „killer cell immunoglobulin-like receptors“ (KIR) aus der Superfamilie der Immunglobuline und zum anderen „killer cell lektin-like receptors“ (KLRs) aus der Familie der Lektine vom C-Typ. Zur letzt genannten Gruppe gehört der „killer cell lektin-like receptor G1“ (KLRG1), der mit Cadherinen interagieren kann. KLRG1 ist ein glykosyliertes Transmembranprotein vom Typ II, dessen zytoplasmatische Domäne ein ITIM (immune receptor tyrosine-based inhibitory motif) enthält<sup>[164]</sup>. Eine Expression wurde auf Effektor- und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen und auf

zytotoxischen CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen von humanen, maturierten, peripheren PBLs gefunden. Die KLRG1-Expression auf T-Zellen war mit einer eingeschränkten Proliferationsfähigkeit verknüpft<sup>[164-166]</sup>.

Das murine KLRG1 bindet an E-Cadherin und geringer an R-Cadherin sowie schwach an N-Cadherin<sup>[167]</sup>. Kürzlich wurde auch die Bindung des humanen KLRG1 an E-Cadherin beschrieben. Bei einer hohen E-Cadherin-Expression auf K-562-Zellen, einer optimalen Zielzelle für NK-Zellen, führte die KLRG1-Expression auf NK-Zellen zur reduzierten zytotoxischen Aktivität<sup>[164]</sup>. Im Gegensatz dazu gibt es aber auch Rezeptoren auf T- und NK-Zellen, die Zelladhensionsmoleküle aus „Adherens Junctions“ binden können, wie Nektine und Nektin-ähnliche Proteine, die einen aktivierenden Einfluss haben. Die Rezeptoren CD226 (DNAM-1) und CRTRAM erkennen CD112 (Nektin-2) und CD96, zusätzlich erkennt CD226 auch CD155 (Necl-5)<sup>[168,169]</sup>. Dies zeigt, dass Effektorzellen mit verschiedenen aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren ausgestattet sind, die an epitheliale Adhensionsmoleküle binden können. Das Auslösen einer Effektorfunktion ist demnach auch auf dieser Ebene von der Balance zwischen aktivierenden und inhibitorischen Signalen abhängig.

## 1.4 Therapie des RCC

Bei der Therapie des lokalen RCCs im Frühstadium ist die chirurgische Entfernung des Tumors die erste Wahl. Bei lokal-fortgeschrittenen RCCs führt eine Resektion des Tumors oft zu Rezidiven und beim mRCC ändert sich der Krankheitsverlauf für gewöhnlich nicht. Darüber hinaus ist das mRCC resistent gegenüber Chemotherapie, Strahlentherapie und Hormontherapie. Die objektive Ansprechrates von häufig verwendeten Chemotherapeutika (Gemcitabin, Fluorouracil, Capecitabin und Vinblastin) lag beim mRCC unter 10 %<sup>[170]</sup>.

### 1.4.1 Therapie des RCCs mit „small molecules“ und monoklonalen Antikörpern

Auf dem Weg zu einer spezifischeren Therapie gegen das RCC wurden „small molecule“ Inhibitoren sowie funktionelle monoklonale Antikörper in klinischen Studien getestet. Hauptsächlich richtet sich diese Form der Therapie gegen Hypoxie-assoziierte Moleküle. Die beiden Multi-Kinase-Inhibitoren Sorafenib und Sunitinib konnten eine verbesserte Ansprechrates und eine verbesserte Überlebensrate in Einzelstudien als Zweittherapie vorweisen. Zudem wurde in einer Phase-III-Studie gezeigt, dass Sunitinib als Ersttherapie effektiver ist, als eine Standard-Therapie mit IFN- $\alpha$ <sup>[170]</sup>. Ein weiterer Angriffspunkt im RCC stellt mTOR (mamallian target of

rapamycin) dar. Die Aktivierung von mTOR durch verschiedene Wachstumsfaktoren resultiert in der Zellzyklus-Progression und der Regulation der Proteinsynthese von Hypoxie-induzierten Genen, wie HIF-1 $\alpha$ . In einer Phase-III-Studie wurde der Erfolg von Temsirolimus, ein Kinase-Inhibitor von mTOR, bei RCC-Patienten mit einer schlechten Prognose evaluiert. Die durchschnittliche progressionsfreie Überlebenszeit konnte im Vergleich zur IFN- $\alpha$ -Therapie von durchschnittlich 5 Monaten auf 10,9 Monate verlängert werden<sup>[171]</sup>. Auch die Therapie mit monoklonalen Antikörpern richtet sich gegen Hypoxie-induzierte Moleküle, wie z.B. der monoklonale Antikörper Bevacizumab. Dieser ist spezifisch gegen VEGF gerichtet und konnte in einer Phase-III-Studie in Kombination mit IFN- $\alpha$  die durchschnittliche progressionsfreie Überlebenszeit knapp verdoppeln (von 5,4 auf 10,2 Monate), im Vergleich zu einer alleinigen IFN- $\alpha$ -Therapie.

Bei einer gerichteten Therapie gegen den EGFR zeigte sich beim RCC weder mit dem Tyrosin-Kinase-Inhibitor Gefitinib noch mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper Cetuximab eine Verbesserung des Krankheitsverlaufes. Der monoklonale Antikörper WX-G250 gegen CA-IX war dagegen vielversprechender und wird in einer Phase-III-Studie getestet<sup>[170,172]</sup>.

Die genannten Inhibitoren und monoklonalen Antikörper sowie weitere Inhibitoren oder neutralisierende Antikörper gegen Wachstumsfaktoren und Kinasen sind noch Gegenstand der Forschung. Einige davon können den Krankheitsverlauf bei vereinzelt Patienten verbessern. Eine Heilung des Tumors ist dennoch nur in wenigen Fällen möglich und fordert nach einer Kombination von individuell abgestimmten Therapien. Zudem ist es nicht nur wichtig, dass sich der Tumor zurückbildet, sondern es ist auch von großer Bedeutung, dass sich keine neuen Tumore in anderen Organen durch Metastasierung bilden können. Somit wäre es ein großer Vorteil, wenn neue Therapieformen gegen das RCC eine MET bei E-Cadherin-negativen Tumorzellen induzieren könnten.

#### 1.4.2 Hormon- und Immun-Therapie des RCCs

Bei 0,2-0,5 % der RCC-Patienten zeigte sich eine spontane Remission von Primärtumoren und Metastasen, die auf eine Antwort des Immunsystems gegen den Tumor zurückgeführt wurden<sup>[173]</sup>. Somit ist es nicht verwunderlich, dass immunologisch wirksame Substanzen wie IL-2 und IFN- $\alpha$  zur Standardtherapie des mRCC gehören. Der Erfolg von IL-2 ist wolmöglich auf die immunstimulatorischen Effekte wie Stimulation der Proliferation, Zytokinsekretion und zytotoxischen Aktivität von Lymphozyten zurück zu führen<sup>[174,175]</sup>. Dennoch lag bei einer Therapie mit IL-2 und IFN- $\alpha$  die objektive Ansprechrates bei Patienten mit mRCC zwischen 10 % und 20 %<sup>[170]</sup>. Der Erfolg einer IL-2 Therapie ist auch mit der Expression von CA-IX

verbunden. So ist eine hohe CA-IX-Expression mit einer guten Prognose assoziiert<sup>[176]</sup>. IFN- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ , jedoch nicht IL-2, sind zudem in der Lage, die CA-IX-Expression zumindest *in vitro* zu steigern<sup>[177]</sup>. Auch die Tatsache sollte beachtet werden, dass IL-2 und IFN- $\alpha$  mit einer hohen Toxizität verbunden sind. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate lag nach IL-2- und IFN- $\alpha$ -Therapie bei 4,5 %, davon waren nur 1,8 % der Patienten vom Tumor befreit<sup>[170]</sup>. Vielversprechender erscheint die kombinierte Immun-Chemotherapie nach Resektion des Primärtumors mit systemischer Gabe von IFN- $\alpha$ , IL-2 und 5-Fluoruracil zu sein, mit Ansprechraten von 20-30 %, die bei der Hälfte aller Fälle zur kompletten oder teilweisen Remission des Tumors führten<sup>[178]</sup>. Die Hoffnung beim mRCC liegt demnach in der Immuntherapie. Wie bereits erwähnt, ist eine effektive Tumorabstoßung durch das Immunsystem beim RCC in der Regel nicht möglich (siehe 1.3). Um diesen Umständen gerecht zu werden, greifen neue Therapieansätze in das Immunsystem ein, indem eine Immunantwort mittels adoptiven Transfers von *in vitro* aktivierten dendritischen Zellen gegen den Tumor gerichtet wird. Dennoch konnten in den meisten klinischen Studien mit DC-Vakzinierung zwar Tumorantigen-reaktive zytotoxische T-Lymphozyten generiert werden, eine Tumorregression wurde jedoch nur vereinzelt beobachtet<sup>[179]</sup>. Zudem ist die Spezifität einer immunbasierten-Vakzinierung von großer Bedeutung, damit alle unterschiedlich differenzierten Zellen eines Tumors eliminiert werden. Dies hat der Fall eines ccRCC-Patienten gezeigt, bei dem sich nach einer radikalen Nephrektomie in Kombination mit einer Hybrid-DC-Tumorzell-Vakzinierung nach 3,5 Jahren ein rein sarkomatoides Rezidiv bildete<sup>[180]</sup>. Möglicherweise waren im Tumor unterschiedlich differenzierte Zellen vorhanden und nur die epithelialen Zellen wurden durch die Immuntherapie eliminiert, sodass aus den überlebenden sarkomatoiden Zellen der neue Tumor entstehen konnte. Es könnte aber auch sein, dass durch die Immuntherapie einige epitheliale Zellen nicht eliminiert werden konnten, aus denen sich z.B. durch den Einfluß von Zytokinen sarkomatoide Zellen dedifferenziert haben.

### **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Eine EMT im RCC wurde zumindest *in situ* bisher nicht beschrieben. Da eine EMT innerhalb der Tumorprogression maßgeblich zur Metastasierung beiträgt, was wiederum die Prognose dramatisch verschlechtert, lautete die erste Frage, ob eine EMT wie in anderen Tumoren auch im RCC beobachtet werden kann. Dazu sollten zunächst EMT-assoziierte Marker *in vitro* untersucht und anschließend eine mögliche Modulation des epithelialen bzw. mesenchymalen Phänotyps durch potentielle EMT-Stimuli oder durch epigenetische Modulation analysiert werden. Im Weiteren sollte die Expressionsanalyse von EMT-assoziierten Markern auf Transkript- und

---

Proteinebene *in situ* auf verschiedene RCC-Subtypen und Differenzierungsstufen ausgeweitet werden.

In den meisten RCCs vom klarzelligen Subtyp wurde ein hypoxisches Milieu vorgefunden, dessen Entstehung oft auf den Verlust von VHL zurück zu führen war<sup>[21]</sup>. Das daraus resultierende Hypoxie-Transkriptom kann zu einer EMT beitragen. Somit sollte versucht werden, ob durch transiente Expression oder RNA-Inhibition von Hypoxie-regulierten Genen eine MET *in vitro* möglich ist.

Im letzten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob der „EMT- bzw. MET-Status“ einer Zelle einen Einfluss auf die Antigenexpression hat und somit eine Interaktion mit Effektor-Lymphozyten beeinflussen kann. Dazu sollte der Phänotyp von RCC-Zellen durch stabilen oder transienten Gen-Transfer moduliert und die immunologische Erkennung von MHC-nicht-restringierten Zellen wie NK- und LAK-Zellen untersucht werden.

## 2 Materialien

### 2.1 Geräte

Absaugpumpe	HLC, Bovenden
Arcturus <sup>XT</sup> PixCell Ile-System	MDS, Sunnyvale (USA)
AxioCam	Zeiss, Göttingen
Bioanalyzer 2100	Agilent, Böblingen
Brutschrank, CO <sub>2</sub> -Auto-Zero	Heraeus, München
Einfrierbox, Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene, Hereford (Großbritannien)
Eismaschine, AF 100AS	Scotsman, Mailand (Italien)
Elektroporator, Gene Pulser Xcell <sup>TM</sup>	Bio-Rad, München
ELISA-Reader, Sunrine	Tecan, Crailsheim
FACSAria <sup>TM</sup> cell sorter	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzzytometer, FACS <sup>TM</sup> Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzzytometer, LSR-II	Becton Dickinson, Heidelberg
Gelapparatur, DNA Sub Cell	Bio-Rad, München
Gelapparatur, Geltray	Renner, Dannstadt
Gelprint 2000i	Biophotonics, Ann Arbor (USA)
HM 505 N Kryostat	MICROM, Walldorf
Kühlschrank/Gefrierfach	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlzentrifuge, Eppendorf Centrifuge 54172	Eppendorf, Hamburg
Laborwaagen, B6, P120, PC 440	Mettler, Giessen
Laminar Flow	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Laserscanning System TCS SP2	Leica Microsystems, Heidelberg
Leica DM IRBE Mikroskop	Leica Microsystems, Heidelberg
Lichtmikroskop	Zeiss, Göttingen
LightCycler <sup>®</sup> 2.0	Roche Diagnostics, Mannheim
Magnetrührer, IKA RCT	Bachofen, Reutlingen
Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
MicroBeam	Palm, Bernried
Mikrotom, HM 335 E	MICROM, Walldorf
Mikrowellengerät, FM 3510	Moulinex, Frankreich
Milli-Q <sup>®</sup> , Reinstwasserherstellungssystem	Millipore, Schwalbach
Neubauer-Zählkammer	neo-Lab, München
Orion II Microplate Luminometer	Berthold Detection Systems, Pforzheim
PCR-Thermocycler T-1	Biometra <sup>®</sup> , Göttingen
pH-Meter pH391	WTW, Weilheim
Pipetten Eppendorf	Roche Diagnostics, Mannheim
Pipetten Gilson	Gilson, Limburg-Offheim
Pipettierhilfe, Pipetus Akku	Hirschmann, Ebersberg
Schüttler, TR 125	Infors, Bottmingen (Schweiz)
Schüttler, Vortex Genie 2	Bachofen, Reutlingen
Severin DG 2423 Dampfgarer	Severin, Sundern
Spektralphotometer, Ultrospec <sup>®</sup> 1100	Amersham Bioscience, Freiburg
Stickstofftank, Chronos Biosafe	Messer Griesheim, Krefeld
T-Gradient PCR	Biometra, Göttingen

Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
UV-Transluminator, 302 nm / 365 nm	Synoptics, Cambridge (UK)
UV-Transluminator, 366 nm	Bachofen, Reutlingen
Wasserbad	Mamert, Schwabbach
XCell II™ Blot Module	Invitrogen, Karlsruhe
XCell SureLock™ Mini-Cell	Invitrogen, Karlsruhe
Zeiss Axiovert 100M	Zeiss, Göttingen
Zentrifuge, Eppendorf Minispin	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, Megafuge1.0R	Heraeus, München
Zentrifuge, Megafuge2.0	Heraeus, München

## 2.2 Sonstige Materialien

1,5/0,5 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Arcturus <sup>XT</sup> Operating Software-v2.0	MDS, Sunnyvale (USA)
CapSure <sup>®</sup> LCM Caps	MDS, Sunnyvale (USA)
CellQuest, FACS™-Software	Becton Dickinson, Heidelberg
Dishes Nunclon™Δ	Nunc, Wiesbaden
Einmalpipetten, 5/10/25 ml	Greiner, Frickenhausen
FACS™ Röhrchen	Peske OHG, Aindling
Falcon-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
FlowJo Software	TreeStar Corp.
Kryo-Röhrchen	Nunc, Wiesbaden
Kulturplatten, 6/12/24/96 Loch	TPP, Trasadingen (Schweiz)
Lab-Tek <sup>®</sup> Chamber Slide	Nunc, Wiesbaden
LCS Software	Leica, Wetzlar
LightCycler <sup>®</sup> Kapillaren	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler <sup>®</sup> Kühlblock	Roche Diagnostics, Mannheim
Light-CyclerSoftware-v4.05	Roche Diagnostics, Mannheim
Nitrilhandschuhe	Semperit, Wien (Österreich)
Nunc Cell Scrapers	Nunc, Wiesbaden
Nunclon™ 25 cm <sup>2</sup> und 80 cm <sup>2</sup>	Nunc, Wiesbaden
NuPAGE <sup>®</sup> Novex Bis-Tris Gels	Invitrogen, Karlsruhe
Palm AdhesiveCaps	Palm, Bernried
Palm@Robo-V2.2	Palm, Bernried
Pasteurpipetten	Peske OHG, München
PEN-Membran-Objektträger	Palm, Bernried
Pipettenspitzen Eppendorf/Gilson	neo-Lab, München
Pipettenspitzen, gestopft	Starlab, Ahrensberg
Spitzbodenplatten (96-Loch)	Greiner, Nürtingen
Transfermembran, Hybond	Amersham Bioscience, Freiburg
X-Ray-Film	Valmex, Augsburg
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> und 175 cm <sup>2</sup> )	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> )	Greiner, München

## 2.3 Chemikalien

10x Taq-Polymerase Puffer	Fermentas, Leon-Rot
1-Brom-3-Chlor-Propan	Sigma, Deisenhofen
1kb-plus DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
2 mM dNTP mix	Fermentas, Leon-Rot
2-Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe
2-Propanol	Sigma, Deisenhofen
2X RNA Loading Dye	Fermentas, Leon-Rot
<sup>51</sup> Cr	ICN Biochemicals, Irvine (USA)
5-Aza-2'-deoxycytidine	Sigma, Deisenhofen
Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose, Ultra Pure	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Merck, Darmstadt
Antibody Diluent	Dako, Hamburg
BSA	Sigma, Deisenhofen
Complete 25-fach	Roche Diagnostics, Mannheim
Cresylviolettacetat	Sigma, Deisenhofen
Dako REAL™ Detection System (LSAB+)	Dako, Hamburg
DEPC	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Merck, Darmstadt
DNA-Autragspuffer (6x)	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
EGTA	Sigma, Deisenhofen
Entwicklerflüssigkeit, Euromed	neo-Lab, München
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
FACS Flow und Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
Fibronektin	Upstate Biotechnology, Lake Placid (USA)
Ficoll	Biochrom, Berlin
Fixierer, Euromed	neo-Lab, München
FKS	Invitrogen, Karlsruhe
FuGENE® HD	Roche Diagnostics, Mannheim
Geneticin®	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycogen	Sigma, Deisenhofen
Hämatoxylin Mayer	Medite, Burgdorf
HCl (Salzsäure)	Merck, Darmstadt
HS (Humanserum)	IMI
Hydrogen Peroxide solution 30% (w/w)	Sigma, Deisenhofen
Hygromycin B	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
LB Broth Base	Invitrogen, Karlsruhe
LDS NuPAGE®	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Frema, München
EMEM mit 2 mM L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe

MES (N-2-Morpholinoethansulfonsäure)	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub>	Sigma, Deisenhofen
Natrium-Acetat	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Nichtessentielle Aminosäuren	Invitrogen, Karlsruhe
Nonidet P-40/IPEGAL	Sigma, Deisenhofen
NuPAGE <sup>®</sup> MOPS Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE <sup>®</sup> Novex Bis-Tris Gels	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE <sup>®</sup> Transfer Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
One Shot <sup>®</sup> TOP10F' Chemically Competent <i>E. coli</i>	Invitrogen, Karlsruhe
OptiMEM <sup>®</sup> I Medium	Invitrogen, Karlsruhe
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Pertex <sup>®</sup>	Medite, Burgdorf
PFA	Sigma, Deisenhofen
Phalloidin	Sigma, Deisenhofen
Phenol	Sigma, Deisenhofen
Phenol:Chloroform 5:1	Sigma, Deisenhofen
PMSF (Phenylmethylsulphonyl Fluorid)	Fluka, Buchs (Schweiz)
Propidiumjodid	ICN, Eschwege
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen
Rapamycin	Sigma, Deisenhofen
Retinsäure (all trans-Retinoic Acid)	Sigma, Deisenhofen
RiboRuler™ High Range RNA Ladder	Fermentas, Leon-Rot
RNaseZap <sup>®</sup>	Ambion, Austin (USA)
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Saponin	Sigma, Deisenhofen
SDS	Sigma, Deisenhofen
Sea Plaque <sup>®</sup> Agarose	Lonza, Verviers (Belgien)
SeeBlue <sup>®</sup> Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, Karlsruhe
SIGMAFAST™ 3,3'-Diaminobenzidine tablets	Sigma, Deisenhofen
SlowFade <sup>®</sup> Gold antifade reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Sorafenib (Nexavar <sup>®</sup> )	Bayer, Leverkusen
Sunitinib (Sutent <sup>®</sup> )	Pfizer, Zürich (Schweiz)
T4-DNA-Ligase Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
TAE (Tris Acetat EDTA) 50x Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Target Retrieval Solution	Dako, Hamburg
TBE (Tris Borat EDTA) 10x Puffer	Ambion, Austin (USA)
TRI-Reagent <sup>®</sup>	Sigma, Deisenhofen
Tris (hydroxymethyl) aminomethan	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trizma <sup>®</sup> Acetate	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Valproic Acid (2-Propylenpentanoic Acid)	Sigma, Deisenhofen

Vectastain Elite ABC-Peroxidase Kit Mouse	Vector, Burlingame (CA)
Xylol	Merck, Darmstadt
Ziegenserum	Dako, Hamburg

## 2.4 Puffer und Lösungen

Trypsin/EDTA:	Trypsin-EDTA 1x in PBS
FACS-Puffer:	1 % FKS in PBS
Zellfixierlösung:	1-4 % PFA in PBS
DEPC-Wasser:	0,1 % DEPC in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
DNA-Agarosegele:	100 ml 1 x TAE, 1-1,8 g Agarose, 7 µl Ethidiumbromid (10 µg/ml)
RNA-Agarosegele:	50 ml 1 x TBE-Puffer, 1 g Agarose, Ultra Pure, 8 µl Ethidiumbromid (10 µg/ml)
Lysepuffer für FFPE-Gewebe:	10 mM Tris-HCl, 100 µM EDTA, 0,2 % SDS, 70 µg Proteinase K
Blockier-Puffer:	8 % FKS, 1 % BSA, 2 % HS in TBS
CB-Puffer:	0,05 % Triton X-100, 1 µg/ml Phalloidin, 10 mM MES pH 6,1, 138 mM KCl, 3 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O, 2 mM EGTA

### Western-Transfer

Lysepuffer:	10 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1 x Complete 25x in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
Blockierlösung:	5 % Magermilchpulver in Waschpuffer
Laufpuffer:	5 % NuPAGE <sup>®</sup> MOPS Puffer in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
Transferpuffer:	5 % NuPAGE <sup>®</sup> Transfer Puffer, 20 % Methanol in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
Waschpuffer:	0,05 % Tween 20 in TBS
10x TBS:	45 mM Tris pH 8,35, 45 mM Borat, 1 mM EDTA in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>

## 2.5 Kits

Biotin-Avidin Blocking Kits	Vektor Laboratories, Burlingame (USA)
Dako REAL™ Detection System (LSAB+)	Dako, Hamburg
Dual-Luciferase <sup>®</sup> Reporter Assay System	Promega, Mannheim
First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche Diagnostics, Mannheim
High Pure RNA Paraffin Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
JETstar Plasmid Purification MAXI KIT	Genomed, Löhne
LightCycler <sup>®</sup> - Primer Set für TGF-β1	Search LC, Heidelberg
LightCycler <sup>®</sup> Fast Start DNA Master <sup>PLUS</sup> SYBR Green I	Roche Diagnostics, Mannheim
MinElute Reaction Cleanup Kit	Qiagen, Chatsworth (USA)
mMESSAGE mMACHINE <sup>®</sup> T7	Ambion, Austin (USA)
NK Cell Negative Isolation Kit	Dynal/Invitrogen, Karlsruhe
Pierce <sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology, Rockford (USA)
Poly(A) Tailing Kit	Ambion, Austin (USA)
Purescript RNA Isolation Kit	Gentra Systems, Minneapolis (USA)
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Chatsworth (USA)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Chatsworth (USA)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Chatsworth (USA)

REGM™ BulletKit®	Cambrex, Charles City (USA)
RNA 6000 Pico LabChip® Kit	Agilent, Santa Clara (USA)
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Chatsworth (USA)
Vectastain Elite ABC-Peroxidase Kit	Vektor Laboratories, Burlingame (USA)
Westernlightning Chemiluminescence	Perkin Elmer, Waltham (USA)

## 2.6 Zellkultur Medien

### Standard-Tumor-Medium

RPMI 1640	
12 %	FKS
1 x	nichtessentielle Aminosäuren
1 x (2 mM)	L-Glutamin (200 mM)
1 x (1 mM)	Natriumpyruvat (100 mM)

### LAK-26-Medium

Standard-Tumor-Medium	
15 %	FKS
1000 IU/ml	IL-2

### Einfriermedium

90 %	FKS
10 %	DMSO

### MDCK-Medium

EMEM mit 2 mM L-Glutamin	
10 %	FKS
1 mM	Natriumpyruvat
0,1 nM	nichtessentielle Aminosäuren
1,5 g/L	Natriumbicarbonat

### NK-Zell-Medium

RPMI 1640	
10 %	HS
50 U	Penicillin
50 µg/ml	Streptomycin

### RPTEC-Medium

REGM™ BulletKit®
------------------

## 2.7 Zellen

HT 1080	ATCC, Rockville (USA)	PC3	R. Riesenberg, LTI, LMU
K-562	ATCC, Rockville (USA)	RCC 1.11	J. Mautner, HMGU
KT 111	DKFZ, Heidelberg	RCC 1.24	J. Mautner, HMGU
KT 13	DKFZ, Heidelberg	RCC 1.26	J. Mautner, HMGU
KT 15	DKFZ, Heidelberg	RCC Baltis	NIH, Rockville Pike (USA)
KT 187	DKFZ, Heidelberg	RCC Garrison	NIH, Rockville Pike (USA)
KT 195	DKFZ, Heidelberg	RCC-26	IMI, HMGU
KT 2	DKFZ, Heidelberg	RCC-53	IMI, HMGU
KT 30	DKFZ, Heidelberg	RCC-N43	Tübingen
KT 53	DKFZ, Heidelberg	RPTEC	ATCC, Rockville (USA)
KT-N15	DKFZ, Heidelberg	SKI 1 (SKRC 38)	Sloan-Kettering Institute
LAK-26	IMI, HMGU	SKI 2 (SKRC 44)	Sloan-Kettering Institute
MaCa1	IMI, HMGU	SKI 3 (SKRC 9)	Sloan-Kettering Institute
MDCK	ATCC, Rockville (USA)	SKI 4 (SKRC 28)	Sloan-Kettering Institute
MRC-5	EATCC, Porton Down (UK)	SKI 6 (SKRC 1)	Sloan-Kettering Institute
MZ 1257	Dr. Jäger, Mainz	SKRC 17	LUMC, Leiden
MZ 2175	Dr. Selinger, Mainz	SKRC 59	LUMC, Leiden
MZ 2733	Dr. Selinger, Mainz	SN 12	?
NK-Zellen	Spender-PBL	SKRC 59/CA-IX	J. Vissers, Nimwegen (Niederlande)
NKC-26	IMI, HMGU	SKRC 59/Vektor	J. Vissers, Nimwegen (Niederlande)

## 2.8 Enzyme

BamHI	Fermentas, Leon-Rot	XbaI	Fermentas, Leon-Rot
BglII	Fermentas, Leon-Rot	XhoI	Fermentas, Leon-Rot
EcoRI	Fermentas, Leon-Rot	XmaI	Fermentas, Leon-Rot
HindIII	Fermentas, Leon-Rot	Protease	Sigma, Deisenhofen
KpnI	Fermentas, Leon-Rot	Proteinase K	Fermentas, Leon-Rot
NotI	Fermentas, Leon-Rot	T4-DNA-Ligase	Fermentas, Leon-Rot
PstI	Fermentas, Leon-Rot	Taq-Polymerase	Promega, Mannheim
SpeI	New England BioLabs, Frankfurt a. M.		

## 2.9 Zytokine/Wachstumsfaktoren

EGF	Invitrogen, Karlsruhe
FGF-2	R&D Systems, Wiesbaden
HGF	R&D Systems, Wiesbaden
TGF- $\beta$ 1	R&D Systems, Wiesbaden
IFN- $\alpha$	R&D Systems, Wiesbaden
IL-2	R&D Systems, Wiesbaden

## 2.10 Antikörper

Spezifität	Konjugat	Klon	Isotyp	Bezugsquelle
CA-IX		303123	Maus IgG <sub>2A</sub>	R&D Systems
CD16	FITC	3G8	Maus IgG <sub>2A</sub>	Beckman Coulter, Fullerton (USA)
CD3	PerCP	SK7	Maus IgG <sub>2A</sub>	BD, Heidelberg
CD56	PE	B159	Maus IgG <sub>1k</sub>	Beckman Coulter, Fullerton (USA)
CD56	APC	N901	Maus IgG <sub>2A</sub>	Beckman Coulter, Fullerton (USA)
CD80	PE	L307.4	Maus IgG <sub>1k</sub>	BD, Heidelberg
E-Cadherin	Alexa <sup>®</sup> 488	67A4	Maus IgG <sub>1k</sub>	BioLegend, San Diego (USA)
E-Cadherin		180215	Maus IgG <sub>2B</sub>	R&D Systems, Wiesbaden
E-Cadherin		36	Maus IgG <sub>2A</sub>	BD, Heidelberg
HIF-2 $\alpha$		Ep190b	Maus IgG	Biozol, Eching
HLA-E		4D1-2-1	Ratte IgG <sub>1</sub>	IMI
KLRG1		13F12F2	Maus IgG <sub>2A</sub>	Prof. Pircher, Freiburg
MICA		159227	Maus IgG <sub>2B</sub>	R&D Systems, Wiesbaden
MICB		236511	Maus IgG <sub>2B</sub>	R&D Systems, Wiesbaden
N-Cadherin		32	Maus IgG <sub>1</sub>	BD, Heidelberg
N-Cadherin		GC-4	Maus IgG <sub>1</sub>	Sigma, Deisenhofen
NY-ESO-1		E978	Maus IgG <sub>1</sub>	Zymed/Invitrogen, Karlsruhe
Pan-Anti-TGF- $\beta$			Kaninchen IgG	R&D Systems, Wiesbaden
Snai1		Sn9H2	Ratte IgG	IMI
ULBP1		170818	Maus IgG <sub>2A</sub>	R&D Systems, Wiesbaden

Spezifität	Konjugat	Klon	Isotyp	Bezugsquelle
ULBP2		165903	Maus IgG <sub>2A</sub>	R&D Systems, Wiesbaden
ULBP3		166510	Maus IgG <sub>2A</sub>	R&D Systems, Wiesbaden
ULBP4		7H2	Ratte IgG <sub>2A</sub>	IMI
VHL		52A11	Maus IgG <sub>1k</sub>	Acris, Hiddenhausen
WT1		6F-H2	Maus IgG <sub>1k</sub>	Dako, Hamburg
β-Catenin		CAT-5H10	Maus IgG <sub>1k</sub>	Zymed/Invitrogen, Karlsruhe

Isotyp-Ak	Konjugat	Klon	Isotyp	Bezugsquelle
Dog CD3		12	Ratte IgG <sub>1</sub>	IMI
GST (R2α)		6G9	Ratte IgG <sub>2A</sub>	IMI
IgG <sub>1</sub>	FITC	MOPC21	Maus IgG <sub>1</sub>	BD, Heidelberg
IgG <sub>2B</sub> Isotyp		20116	Maus IgG <sub>2B</sub>	R&D Systems, Wiesbaden
IgG <sub>2Ak</sub> Isotyp		UPC10	Maus IgG <sub>2A</sub>	Sigma, Deisenhofen

Sekundär-Ak	Konjugat	Isotyp	Bezugsquelle
Maus-IgG <sub>1</sub>	Alexa <sup>®</sup> 555	Ziege IgG	Invitrogen, Karlsruhe
Maus-IgG <sub>2B</sub>	Alexa <sup>®</sup> 647	Ziege IgG	Invitrogen, Karlsruhe
Maus-IgG <sub>2A</sub>	Alexa <sup>®</sup> 647	Ziege IgG	Invitrogen, Karlsruhe
Maus IgG (H+L)	HRP	Schaaf IgG	Jackson Research, West Grove (USA)
Ratte IgG (H+L)	Biotin	Kaninchen IgG	Vector, Burlingame (USA)
Maus IgG + IgM	PE	Ziege F(ab') <sub>2</sub>	Dianova, Hamburg

## 2.11 Plasmide

pcDNA3.1	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3.1/E-Cadherin	diese Arbeit
pcDNA3.1/VHL	diese Arbeit
pcDNA3.1/HIF3α4	Dr. M. Ohh (Department of Laboratory Medicine and Pathology, Toronto, USA)
pGI4.14[ <i>luc2</i> /Hygro]	Promega, Mannheim
pGI4.14/Ecad.pr.WT	diese Arbeit
pGL3BEcad.pr.WT	Dr. G. Berx (Flanders Interuniversity Institute of Biotechnology, V.I.B.)
pBK-CMV/E-Cad.WT	Prof. K. F. Becker, Pathologie TMU
pAc-GFP-N1	Clontech, Mountain View (USA)

## 2.12 siRNA

siGENOME <sup>™</sup> SMARTpool <sup>®</sup> HIF-1α	Dharmacon, Chicago (USA)
siGENOME <sup>™</sup> SMARTpool <sup>®</sup> HIF-2α	Dharmacon, Chicago (USA)

## 2.13 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden mit der Software „Primer3“ ausgewählt und von MWG Biotech (Ebersberg) oder Sigma-Genosys (Steinheim) synthetisiert.

Oligonukleotide für die qRT-PCR aus kryopräserviertem Gewebe oder Zelllinien/Primärzellen

Spezifität		Sequenz
18S rRNA	5′	CGGCTACCACATCCAAGGAA
	3′	GCTGGAATTACCGCGGCT
E-Cadherin	5′	GAACAGCACGTACACAGCCCT
	3′	GCAGAAGTGTCCCTGTTCCAG
N-Cadherin	5′	CCATCACTCGGCTTAATGGT
	3′	ACCCACAATCCTGTCCACAT
Snai2	5′	AAGGACCCACATCCTTCTC
	3′	TACAAAAACCCACGCAGACA
SIP1	5′	CGCTTGACATCACTGAAGGA
	3′	CTTGCCACACTCTGTGCATT
Snai1	5′	CGGGCTTTATTGGCATCTTA
	3′	TTTCTGTGTCTCAGCCATGC
WT1	5′	CAGTTCCCCAACCACTCATT
	3′	CATCTGATTCCAGGTCATGC
VHL	5′	AGGTCACCTTTGGCTCTTCA
	3′	ACATTTGGGTGGTCTTCCAG
MMP-2	5′	TGACATCAAGGGCATTTCAGGAGC
	3′	GTCCGCCAAATGAACCGGTCCTTG
MMP-9	5′	TTGACAGCGACAAGAAGTGG
	3′	GCCATTCACGTCGTCCTTAT
HIF-1α	5′	GCAAGCCCTGAAAGCG
	3′	GGCTGTCCGACTTTGA
HIF-2α	5′	GTCTCTCCACCCCATGTCTC
	3′	GGTTCTTCATCCGTTTCCAC
HIF-3α4	5′	GGACAAGGCCTCTATCATGC
	3′	TTGCTGACATTCTCCGACAG
MMP-7	5′	AAAGAGATCCCCCTGCATTT
	3′	GTGAGCATCTCCTCCGAGAC
CA-IX	5′	GTCTCGCTTGGAAGAAATCG
	3′	CTCCTCCAGCGACAAACAAT
CXCR4	5′	GGTGGTCTATGTTGGCGTCT
	3′	TGGAGTGTGACAGCTTGGAG
CXCL12	5′	TCAGCCTGAGCTACAGATGC
	3′	CTTCGGGTCAATGCACACTT
VEGF	5′	GGGCAGAATCATCACGAAGT
	3′	ATCTGCATGGTGTGTTGGA
cMET	5′	CTCCTCTGGGAGCTGATGAC
	3′	GGTGCCAGCATTTTAGCATT
Cyclin D1	5′	CTGGAGGTCTGCGAGGAACA
	3′	GCTTCGATCTGCTCCTGGCA

Oligonukleotide für die qRT-PCR aus Formalin-fixiertem Gewebe

Spezifität		Sequenz	Produktgröße (bp)
18S rRNA	5'	CCCTGTAATTGGAATGAGTCCAC	89
	3'	GCTGGAATTACCGCGGCT	
E-Cadherin	5'	GAACAGCACGTACACAGCCCT	76
	3'	GCAGAAGTGTCCCTGTTCCAG	
E12/E47	5'	CGGTCATCCTGAACCTGGAGC	82
	3'	TTCTCTTCTCGCCGTTTCAA	
Snai2	5'	TGTGTGGACTACCGCTGC	63
	3'	TCCGGAAGAGGAGAGAGG	
SIP1	5'	GCGGCATATGGTGACACACAA	80
	3'	CATTTGAACTTGCGATTACCTGC	
Snai1	5'	TGCAGGACTCTAATCCAAGTTTACC	71
	3'	GTGGGATGGCTGCCAGC	
deltaEF1	5'	GCCAATAAGCAAACGATTCTG	100
	3'	TTTGGCTGGATCACTTTCAAG	
VHL	5'	GATCTGGAAGACCACCCAAA	84
	3'	TCAATCTCCCATCCGTTGAT	
MMP-2	5'	TTGACGGTAAGGACGGACTC	99
	3'	CTCCAAGTCCATAGCTCA	
MMP-9	5'	GGCGCTCATGTACCCTATGT	67
	3'	GCCATTCACGTCGTCCTTAT	
HIF-1 $\alpha$	5'	CTGACCCTGCACTCAATCAA	82
	3'	TGGGGCATGGTAAAAGAAAG	
HIF-2 $\alpha$	5'	ACAACAACCTGCCCTCCTCAC	88
	3'	TGCTGGATTGGTTCACACAT	
HIF-3 $\alpha$ 4	5'	CTGTCCGAGAATGTCAGCAA	84
	3'	ACAGGGGTGGATGAAATCAA	
VEGF	5'	TCGGGAACCAGATCTCTCAC	
	3'	TCTGTCGATGGTGATGGTGT	
WT1	5'	CAGGCCAGGATGTTTCCTAA	
	3'	GACCGTGCTGTAACCCTGAT	
MMP-7	5'	AGCTCATGGGGACTCCTACC	
	3'	GTGAGCATCTCCTCCGAGAC	
CA-IX	5'	GTCTCGCTTGGAAAGAAATCG	
	3'	TGAAGTCAGAGGGCAGGAGT	
PDH- $\beta$	5'	GGTATGGATGAAGACCTGGA	DNA 185
	3'	CTTCCACAGCCCTCGACTAA	RNA 103

Oligonukleotide für die Gesamt-cDNA-Amplifizierung von VHL

Spezifität		Sequenz	Schnittstelle
VHL	5'	CTAGCTAGCATGCCCCGGAGGGCGGAGAA	NheI
	3'	CGGGGTACCTCAATCTCCCATCCGTTGAT	KpnI

## 3 Methoden

### 3.1 Methoden zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen

#### 3.1.1 Grundtechniken der Zellkultur

Alle in dieser Arbeit verwendeten humanen Zellen und Säugetierzellen wurden in Brutschränken (Heraeus) bei 5-7 % CO<sub>2</sub>, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Zellkulturarbeiten wurden unter Standardbedingungen aseptisch in Sterilbänken ausgeführt.

Um die Zellen in Kultur zu nehmen, wurden sie bei 37°C aufgetaut und in Zellkulturschalen ausgesät. Alle 2-4 Tage wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt und stets vor oder bei Erreichen der Konfluenz passagiert. Bei Suspensionszellen wurde nach Zentrifugation der Zellen das Medium erneuert. Das Einfrieren der Zellen erfolgte in Einfriermedium (90 % FBS, 10 % DMSO) in Kryoröhrchen (Nunc) mit Hilfe eines „Nalgene® Cryo 1°C Freezing Container“. Zur Lagerung wurden sie in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt. Die Bestimmung der Zellanzahl erfolgte nach einer Trypanblau-Färbung mit einer Neubauer-Zählkammer.

#### 3.1.2 Kultivierung von Spheroïden

Zur Herstellung der Spheroïde wurde eine 1 %-ige Sea Plaque® Agarose-Lösung in RPMI 1640 Medium erwärmt und in eine 24-Loch-Platte gegeben. Durch Rotieren der Platte bildete sich in jedem Loch zum Boden hin eine Vertiefung, in der sich die anschließend ausgesäten Zellen ( $5 \times 10^5$  pro Loch) nach erneutem Rotieren zu Spheroïden formen konnten. Diese wurden in Standard-Tumor-Medium (RPMI 1640 mit 12 % fötalem Kälberserum (FKS), 1x nichtessentielle Aminosäuren, 2 mM L-Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat) für 24 oder 48 h kultiviert.

#### 3.1.3 Kultivierung von humanen Primärzellen und Effektorzellen

Negativ-isolierte NK-Zellen aus PBL (peripheren Blutlymphozyten) wurden in RPMI 1640 mit 15 % HS, Penicillin/Streptomycin und 300 IU/ml IL-2 kultiviert.

LAK-26-Zellen wurden in RPMI 1640 mit 15 % FKS, 0,1 mM nichtessentielle Aminosäuren, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat und 1000 IU/ml IL-2 kultiviert.

RPTEC wurde mit Medium, Zusätzen und Komponenten des REGM™ BulletKit® kultiviert. Anstelle von PBS wurden die Kit-Komponenten HEPES-Puffer verwendet und zum Abstoppen der Trypsinbehandlung eine Trypsin-Neutralisierungslösung.

MRC-5 wurde in Standard-Tumor-Medium (siehe 3.1.2) kultiviert.

## 3.2 Durchflusszytometrie (FACS)

Mit der Durchflusszytometrie wurde die Expression von intra- und extrazellulären Proteinen einer Zelle gemessen. Dabei wurden die Proteine von spezifischen Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Primär-Antikörpern direkt oder durch einen Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundär-Antikörper indirekt gebunden. Die durchflusszytometrischen Analysen wurden am FACS™ Calibur („fluorescence-activated cell sorter“) oder LSR-II-Gerät durchgeführt.

Dabei wird die markierte Zell-Suspension direkt aus dem Probenröhrchen durch Überdruck in eine Messküvette geleitet. Eine Trägerflüssigkeit beschleunigt die Partikel der Suspension und transportiert sie zum Messpunkt des Gerätes (Hydrodynamische Fokussierung). Dort passieren die Zellen vereinzelt einen Argonlaserstrahl mit der Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{Abs}} = 488 \text{ nm}$  oder einen Kryptonlaser mit der Wellenlänge  $\lambda_{\text{Abs}} = 568 \text{ nm}$ . Dabei wird Laserlicht gestreut und die Fluoreszenzmoleküle, mit denen die Zellen markiert wurden, werden angeregt. Die Wellenlänge des emittierten Lichts der angeregten Elektronen ist von dem jeweilig verwendeten Fluoreszenzfarbstoff abhängig. Das Licht wird von Sammellinsen eingefangen und über verschiedene Spiegel und Filter an die Detektoren weitergeleitet. Sowohl das Streulicht, das Informationen über die Größe (Vorwärtsstreuung, FSC) und Granulation (Seitwärtsstreuung, SSC) der Zelle liefert, als auch die Fluoreszenzemission, die eine quantitative Aussage über die Bindung des Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Ak und demzufolge über die Expression des ausgewählten Moleküls ermöglicht, werden gemessen. Über die Kombination mehrerer Antikörper (Ak) (Mehrfarbenfluoreszenzanalyse) konnten mehrere unterschiedliche Zelleigenschaften (Phänotyp) miteinander verglichen werden. Diese Informationen wurden mit der Software „CellQuest“ (am FACS™ Calibur) oder der „FacsDiva“-Software (am LSR-II) aufgenommen und ausgewertet.

### 3.2.1 Färbung von Oberflächenproteinen

Die Expression von einigen Oberflächenmolekülen wurde mit direkt konjugierten Ak gemessen. Dabei handelte es sich um FITC-, Alexa® 488-, PE-, PerCP- oder APC-gekoppelte Ak (FITC: Fluorescein Isothiocyanat; PE: Phycoerythrin; PerCP: Peridin-Chlorophyll-Protein; APC: Allophycocyanin) (Tab.3).

Nach der Ernte der Zellen wurden  $0,5-2 \times 10^5$  Zellen durch Zentrifugation sedimentiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 50  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer resuspendiert. Zu dieser Zellsuspension wurden monoklonale Ak gegeben. Die Inkubationszeit lag zwischen 45 und 60 min und wurde auf Eis im Dunkeln durchgeführt. Durch Waschen der Zellen mit FACS-Puffer wurden nicht gebundene Ak entfernt.

Schließlich wurden die Zellen entweder bei unmarkierten Primär-Antikörpern mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundär-Antikörper erneut auf gleiche Weise inkubiert oder in einer 1 %-igen Paraformaldehyd (PFA) -Lösung fixiert und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln gelagert. Für eine Lebend-/Tot-Unterscheidung wurden die Zellen alternativ in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und kurz vor der FACS-Analyse mit Propidiumjodid (PI) gefärbt. Hierfür wurde direkt vor der Messung PI (0,5 µg/ml Endkonzentration) in den FACS-Puffer zugegeben. Propidium-Kationen interkalieren nur in die DNA toter Zellen, da sie eine intakte Zellmembran nicht passieren können und sind über ihr spezifisches Emissionsspektrum detektierbar.

### 3.2.2 Färbung von intrazellulären Proteinen

Für die FACS-Analyse von intrazellulären Proteinen wurden die Zellen in einer 1 %-igen PFA-Lösung 30 min auf Eis fixiert und nach einem Waschschrift die Zellmembran mit Hilfe einer 0,1 %-igen Saponin-Lösung permeabilisiert, um den Ein-

**Tab.3: Verwendete Primär-, Isotyp- und Sekundär-Antikörper für die FACS-Analyse.**

Primär-Antikörper	Konjugat	Verdünnung	Spezies	Bezugsquelle
CA-IX		1:25	Maus	R&D Systems, Wiesbaden
E-Cadherin		1:25	Maus	R&D Systems, Wiesbaden
E-Cadherin	Alexa <sup>®</sup> 488	1:20	Maus	BioLegend, San Diego (USA)
CD56	PE	1:250	Maus	Beckman Coulter, Fullerton (USA)
CD56	APC	1:25	Maus	Beckman Coulter, Fullerton (USA)
CD16	FITC	1:25	Maus	Beckman Coulter, Fullerton (USA)
CD3	PerCP	1:25	Maus	BD, Heidelberg
CD107a	FITC	1:40	Maus	BD, Heidelberg
CD107b	FITC	1:40	Maus	BD, Heidelberg
ULBP1		1:25	Maus	R&D Systems, Wiesbaden
ULBP2		1:25	Maus	R&D Systems, Wiesbaden
ULBP3		1:25	Maus	R&D Systems, Wiesbaden
ULBP4		1:25	Ratte	intern
MICA		1:25	Maus	R&D Systems, Wiesbaden
Isotyp-Antikörper	Isotyp	Verdünnung	Spezies	Bezugsquelle
MICB		1:25	Maus	R&D Systems, Wiesbaden
HLA-E (4D1-2-1)		1:1	Ratte	intern
Isotyp IgG <sub>2B</sub>	IgG <sub>2B</sub>	1:25	Maus	R&D Systems, Wiesbaden
UPC10	IgG <sub>1</sub>	1:25	Maus	Sigma, Deisenhofen
GST 6G9 (R2α)	IgG <sub>2A</sub>	1:1	Ratte	intern
Dog CD3	IgG <sub>1</sub>	1:1	Ratte	intern

Fortsetzung Tab.3: Verwendete Primär-, Isotyp- und Sekundär-Antikörper für die FACS-Analyse.

Sekundär-Antikörper	Konjugat	Isotyp	Verdünnung	Spezies	Bezugsquelle
$\alpha$ -IgG <sub>2B</sub>	Alexa <sup>®</sup> 647		1:400	Maus	Invitrogen, Karlsruhe
Ziege- $\alpha$ -Maus	PE	F(ab') <sub>2</sub>	1:200/1:400	Ziege	Dianova, Hamburg
Ziege- $\alpha$ -Ratte	PE	F(ab') <sub>2</sub>	1:200	Ziege	Dianova, Hamburg

tritt der Ak in die Zelle vorzubereiten. Dazu wurde der Primär-Antikörper in einer 0,25 %-igen Saponin-Lösung zu den Zellen gegeben und 1 h auf Eis inkubiert. Ungebundene Ak wurden in einem Waschschrift mit 0,1 %-iger Saponin-Lösung entfernt. Anschließend wurde der Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sekundär-Ak auf gleiche Weise für 45 min im Dunkeln inkubiert und für die FACS-Analyse nach Sedimentierung der Zellen in FACS-Puffer aufgenommen.

### 3.2.3 Sortierung von Zellen mit dem MoFlo™

Die Sortierung der E-Cadherin-positiven Zellen der E-Cadherin-Transfektante von RCC-26/E3 wurde mit dem MoFlo™ High-Performance Cell Sorter am Institut für Molekulare Immunologie (IMI) des Helmholtz Zentrum München durchgeführt. Dazu wurden  $10 \times 10^6$  Zellen geerntet und das sedimentierte Pellet in 500  $\mu$ l FACS-Puffer mit einem E-Cadherin-Ak im Verhältnis 1:17 resuspendiert und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde das sedimentierte Pellet mit einem PE-gekoppelten Ziege-Anti-Maus-Antikörper im Verhältnis 1:200 in 500  $\mu$ l FACS-Puffer für eine Stunde auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde das Pellet in 1 ml Sortier-Puffer (PBS mit 0,5 % FKS und 2 mM EDTA) aufgenommen und die mit dem MoFlo™ in PE-positiv- und PE-negativ-sortierten Zellen in RPMI 1640 Medium aufgenommen.

### 3.3 Magnetische Anreicherung von NK-Zellen

NK-Zellen wurden aus PBL mit Hilfe des „NK Cell Negative Isolation Kit“ (Dyna) nach Angaben des Herstellers angereichert. Dazu wurde Vollblut von freiwilligen gesunden Spendern abgenommen, mit Natrium-Heparin versetzt und mit Hilfe der Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation die PBL gewonnen.

Das Prinzip beruht auf der Inkubation der PBL-Zellsuspension mit Ak, welche an super-paramagnetische Partikel gekoppelt sind und einer anschließenden Trennung der magnetisch gebundenen von nicht gebundenen Zellen. Nicht-NK-Zellen, wie z.B. T-Zellen, B-Zellen, Dendritische Zellen, Monozyten, Granulozyten und erythroide Zellen wurden indirekt magnetisch markiert, indem die Zellsuspension mit einer Ak-

Mischung bestehend aus biotinylierten Ak gegen CD3, CD14, CD36, CDw123, HLA Klasse II DR/DP und Glycophorin A inkubiert wurde. Nach anschließender Inkubation mit magnetischen Anti-Biotin-Kügelchen wurde die Zellsuspension mittels eines Magneten aufgereinigt. Nicht-NK-Zellen wurden in der Nähe des Magneten immobilisiert, wodurch im Überstand die aufgereinigten, unberührten NK-Zellen erhalten wurden. Die angereicherten Fraktionen wurden anschließend im Durchflusszytometer auf ihre Reinheit hin kontrolliert.

### 3.4 Stimulation von Zellen

Die Stimulationen von humanen Zelllinien wurden, je nach Versuchsanordnung, unterschiedlich durchgeführt. In Tabelle 4 sind sämtliche Stimuli und die verwendeten Konzentrationen aufgeführt.

Stimuli	Konzentration	Rekonstitution	Bezugsquelle
5-Aza-CdR	2 µM	DMSO	Sigma
VPA	3 mM	-	Sigma
Sorafenib	15 µM	DMSO	Nexavar®
Sunitinib	20 nM	DMSO	Sutent®
Rapamycin	20 nM	DMSO	Sigma
Retinsäure	2 µM	DMSO	Sigma
EGF	10 ng/ml	PBS, 1 % BSA	Gibco
FGF-2	10 ng/ml	PBS, 1 % BSA	R&D
HGF	20 ng/ml	PBS, 1 % BSA	R&D
TGF-β1	10 ng/ml	PBS, 1 % BSA	R&D
IFN-α	1000 IU/ml	PBS, 1 % BSA	R&D
Pan-spezifischer-TGF-β Ak	25 µg/ml	PBS, 1 % BSA	R&D

Tab.4: Konzentrationen der verwendeten Stimuli

### 3.5 Proteinanalytische Arbeiten

#### 3.5.1 Western-Transfer

##### 3.5.1.1 Lyse der Zellen

Die Zellen wurden in geeigneten Petrischalen (Nunc) kultiviert und nach zweimaligem Waschen mit PBS mit Hilfe eines Lysepuffers (10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40/IPEGAL, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF) lysiert und mechanisch mit einem Zellschaber in ein Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation wurden die Zellproteine von den Zelltrümmern, der DNA und RNA, getrennt.

### 3.5.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde nach der Methode von Smith *et al.*, 1985<sup>[181]</sup> unter Verwendung des „Pierce® BCA Protein Assay Kits“ (Pierce) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Diese basiert auf der alkalischen Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  (Biuret Reaktion) durch Proteine. Das  $\text{Cu}^+$  bildet mit Bicinchrömsäure (BCA) einen lila Farbkomplex, der durch photometrische Messung im ELISA-Reader „Sunrine“ (Tecan) bei 595 nm bestimmt wurde. Die Absorptionswerte konnten durch parallele Quantifizierung von BSA-Standards (Bovine Serum Albumin) über drei Zehnerpotenzen in Proteinkonzentrationen umgerechnet werden.

### 3.5.1.3 Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese

Durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden, da durch die Anlagerung von SDS-Molekülen deren Tertiär- und Quartärstruktur zerstört, sowie Ladungsunterschiede neutralisiert werden.

Dazu wurde ein „NuPage® 10 % Bis-Tris-Gel 1.0 mm“ in einer „XCell SureLock™ Mini-Cell“ befestigt und die Proteinlysate in vergleichbaren Konzentrationen aufgetragen. Als Marker wurde „SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard“ verwendet. Die Proben liefen für 10 min bei 100 Volt und 4 °C ins Sammelgel ein und wurden dann bei 200 V für 40 min im Trenngel aufgetrennt. Alle verwendeten Materialien wurden von Invitrogen bezogen.

### 3.5.1.4 Detektion der Proteine mit Antikörpern

Für eine Detektion der Proteine mit Ak wurden die Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-(„Hybond“) Membran in einem „XCell II™ Blot Module“ (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers transferiert. Die Membran wurde anschließend mit 0,05 % TBST gewaschen und mindestens eine Stunde in 7 %-igem Milchpulver blockiert. Anschließend wurde der Primär-Ak über Nacht bei 4°C auf dem Roller inkubiert. Die Ak E-Cadherin (BD) und N-Cadherin (Sigma) wurden im Verhältnis 1:500 mit 5 %-igem Milchpulver verdünnt. Nach drei Waschschröppen mit 0,05 %-igem TBST wurde die Membran mit einem mausspezifischen Meerrettichperoxidase-gekoppelten Ak (Jackson Research) (1:3000) für eine Stunde inkubiert und nochmals gewaschen. Die Detektion der Proteine durch die Ak erfolgte mit Hilfe des Kits „Westernlightning Chemiluminescence“ (Perkin Elmer). Dabei werden durch die Meerrettichperoxidase zyklische Diacylhydrazide wie Luminol im

Alkalischen oxidiert. Das durch die Chemilumineszenz ausgesendete Licht (Maximum bei  $\lambda=428$  nm) wurde durch Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm nach dessen Entwicklung detektiert.

### 3.6 Molekularbiologische Arbeiten mit DNA

#### 3.6.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion bietet die Möglichkeit, einen DNA-Bereich zwischen zwei bekannten Regionen mittels Oligonukleotiden (Primer) *in vitro* zu amplifizieren. Diese sind komplementär zum jeweiligen Template-DNA-Strang und flankieren die zu amplifizierende Sequenz. Die hierzu verwendeten Oligonukleotide wurden mit der Software „Primer3“ ausgewählt. In einem sich 30-45x wiederholenden Zyklus aus Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Oligomere (Annealing der Primer) an die Muster-Stränge und Synthese des komplementären Stranges, ausgehend von den Hybridisierungsstellen der Primer, wird der zwischen den Oligonukleotiden liegende Sequenzbereich exponentiell amplifiziert<sup>[182]</sup>.

**Tab.5: Standard-PCR-Pipettierschema einer 50  $\mu$ l Reaktion und Beispiel eines häufig verwendeten PCR-Programms**

Volumen	Komponenten
x $\mu$ l	DNA (100 ng)
5 $\mu$ l	10 x Taq-Polymerase Puffer
2 $\mu$ l	dNTP-Mix (je 10 mM)
2 $\mu$ l	5'-Primer (10 mM)
2 $\mu$ l	3'-Primer (10 mM)
0,5 $\mu$ l	Taq-Polymerase (1 U)
ad 50 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>

Temperatur	Zyklusdauer	Wiederholung
95°C	2:00 min	
95°C	0:30 min	30-45x
57°C	0:30 min	
72°C	1:30 min	
72°C	2:00 min	
4°C	unendlich	

#### 3.6.2 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und von PCR-Fragmenten, bei denen mittels geeigneter Primer in der PCR-Reaktion Restriktionsschnittstellen angefügt wurden, erfolgte in den vom Hersteller empfohlenen Inkubationspuffern über einen Zeitraum von 2-3 h beim Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms. Bei Doppel- oder Multiverdau wurde der am besten kompatible Puffer verwendet.

### 3.6.3 Verknüpfung von DNA-Fragmenten

Bei Klonierungsarbeiten wurde nach Restriktionsverdau des Vektors und des Inserts eine Verknüpfung der DNA-Enden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (Fermentas) bei 16°C über Nacht nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert bei der Ligation die Bildung von Phospho-diesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxyterminus von Polynukleotiden.

### 3.6.4 DNA-Aufreinigung

Eine DNA-Aufreinigung wurde je nach Anforderung mit Hilfe verschiedener Methoden durchgeführt. Bei Klonierungsarbeiten wurde der Restriktionsverdau über Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und das gewünschte Fragment aus dem Gel ausgeschnitten. Mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) wurde dieses über ein Säulensystem nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Die DNA-Aufreinigung aus einem Restriktionsverdau für die anschließende DNA-Ligation wurde mit Hilfe des „MinElute Reaction Cleanup Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Für die Aufreinigung eines größeren Restriktionsverdau-Ansatzes, wie nach Plasmid-Linearisierung für die *ivtRNA* (*in vitro* transcribed RNA) -Herstellung, wurde eine Ethanol-Fällung bei -20°C für mindestens 1 h durchgeführt.

### 3.6.5 Plasmidgewinnung aus *E.coli*

Für die Amplifizierung von Plasmid-DNA (pDNA) wurde eine Hitzetransformation mit Hilfe von „One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*“ (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die transformierten Zellen wurden über Nacht auf Agar-Platten kultiviert, die mit dem entsprechenden Antibiotikum angereichert wurden, um nur den transformierten *E. coli* ein Wachstum zu ermöglichen. Einzelklone von *E. coli* wurden entweder in 3 ml LB-Medium für eine „Mini-Prep“ oder in 300 ml LB-Medium für eine „Maxi-Prep“ mit dem entsprechenden Antibiotika über Nacht bei 37°C im Schüttler kultiviert. Mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen) oder des „JETstar Plasmid Purification MAXI KIT“ (Genomed) wurde die pDNA nach Angaben des Herstellers isoliert. Transformierte *E. coli*-Kulturen wurden in LB-Medium mit 15 % Glycerin bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

### 3.6.6 DNA-Extraktion aus humanen Zelllinien

Für die Sequenzanalyse des VHL-Gens wurde die DNA aus RCC-26 und RCC-53 mit Hilfe des „QIAamp DNA Mini Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert.

### 3.6.7 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Zur quantitativen Konzentrationsbestimmung der RNA- und DNA-Lösungen wurde mit dem Spektralphotometer die Absorption (OD, optische Dichte) bei 260 nm bestimmt. Dazu wurden die Proben mit H<sub>2</sub>O 1:50 verdünnt, so dass die Extinktionswerte etwa in dem Bereich von 0.1-1 zu erwarten waren. Die Konzentration der Probe lässt sich durch folgende Formel ermitteln:

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = \text{OD}_{260} \text{ (DNA)} \times 50 \times \text{Verdünnung}$$

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = \text{OD}_{260} \text{ (RNA)} \times 40 \times \text{Verdünnung}$$

Zur Reinheitsbestimmung der Nukleinsäuren wurde das Verhältnis  $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$  gebildet. Für eine ausreichend reine RNA/DNA sollte dieses Verhältnis  $2.0 \pm 0.2$  ergeben<sup>[183]</sup>. Kleinere Werte sind ein Hinweis auf Verunreinigung mit Substanzen, die bei 280 nm absorbieren (z.B. Proteine, Phenol).

### 3.6.8 Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von PCR-Produkten zur Überprüfung der Spezifität oder von pDNA wurde kommerziell von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt.

Die MLPA- (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) und Sequenzanalyse des VHL-Gens wurden von Dr. Ehlers des Zytogenetischen und Molekulargenetischen Labors von Dr. Prager und Dr. Junge in Dresden durchgeführt.

### 3.6.9 cDNA-Synthese

Bei der cDNA (complementary DNA) -Synthese wird die isolierte mRNA (messenger RNA) in cDNA umgeschrieben. Für diese Methode wurde der "First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)" (Roche) verwendet. Für die cDNA-Synthese von RNA aus Formalin-fixierten Gewebeproben wurden im Verhältnis 4:1 Primer eingesetzt, die zufällig an die RNA binden ( $(\text{p(dN)}_6)$ ), zusammen mit Primern, die an das polyadenylierte Ende binden ( $\text{Oligo-p(dT)}_{15}$ ). Für alle anderen cDNA-Synthesen wurden die Primer wie im folgenden Pipettierschema verwendet:

Volumen	Konzentration	Komponenten
max. 11,2 µl	1 µg	RNA
2 µl	1x	10x Reaktions-Puffer
4 µl	5 mM	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
2 µl	1 mM	dNTPs
2 µl	1,6 µg	Oligo-p(dT) <sub>15</sub> Primer
1 µl	50 U	<i>RNase Inhibitor</i>
0,8 µl	20 U	<i>AMV Reverse Transkriptase</i>
ad 20 µl		H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>

Tab.6: Pipettierschema für die cDNA-Synthese

Temperatur	Zyklusdauer	Schritt
25°C	10:00 min	Anlagerung
42°C	60:00 min	Reverse Transkription
99°C	5:00 min	AMV Denaturierung
4°C	unendlich	Abkühlen

Tab.7: PCR-Programm für die cDNA-Synthese

### 3.6.10 Quantitative RT-PCR

Die quantitative „Reverse Transcription-PCR“ (qRT-PCR) mit Hilfe des LightCycler™-Systems (Roche) ist eine hoch-sensitive Methode, um die Ausgangsmenge an mRNA einer Probe zu bestimmen. Das Prinzip der Methode basiert darauf, dass die Zyklenzahl, nach der die PCR-Reaktion in den linear-logarithmischen Bereich eintritt (d.h. näherungsweise eine Verdoppelung der Amplifikatmenge nach jedem Zyklus), abhängig von der eingesetzten Transkriptmenge ist. Je größer die Ausgangsmenge, desto früher geht die PCR-Reaktion in den logarithmisch-linearen Bereich über. In dem Master-Mix für die qRT-PCR ist unter anderem der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green enthalten. SYBR-Green ist in der Lage, sich in doppelsträngige Nukleinsäuren einzubauen, was mit jedem Zyklus der Amplifikation zu einer Steigerung der Fluoreszenzintensität der Produkte führt. Diese Eigenschaft ermöglicht es, anhand der Fluoreszenz die quantitativen Mengen zwischen zwei Vergleichsproben zu ermitteln. Um die Ausgangsmengen an cDNA in den verschiedenen Proben relativ zueinander zu vergleichen, wird mit Hilfe einer sogenannten Kreuzungslinie („crossing-line“) ein bestimmter Fluoreszenzwert festgelegt. Die Kreuzungslinie sollte bei allen Experimenten den linear-logarithmischen Bereich der Kurve schneiden und auf der gleichen Höhe liegen, um die Reproduzierbarkeit der Experimente zu gewährleisten. Diese wurde bei allen Versuchen mit Hilfe der Software „Light-CyclerSoftware-v4.05“ auf den Fluoreszenzwert („background fluorescence“)  $2,0^{-2}$  gelegt und auf den Korrekturwert für das Hintergrundrauschen („noise band“)  $2,0^{-1}$ . Die Zyklenzahl, bei der die Fluoreszenz der Amplifikate diesen Wert erreicht, entspricht dem Kreuzungspunkt (CP, „crossin point“). Je höher die Zyklenzahl, desto niedriger die Transkript-Menge. Zur Normalisierung aller zu vergleichenden Proben

wurde das Haushaltsgen 18S-rRNA verwendet. Eine Normalisierung erfolgte durch Subtraktion des CP-Werts für 18S-rRNA der zu analysierende Probe vom CP-Wert für das untersuchte Transkript.

Volumen	PCR-Komponenten
2 µl	cDNA (1:1 mit H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> verdünnt)
4 µl	SYBR Green Mastermix (Roche)
2 µl	5' - Primer (5 pmol/µl)
2 µl	3' - Primer (5 pmol/µl)
10 µl	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
20 µl	Gesamtvolumen

**Tab.8: Pipettierschema für die qRT-PCR-Analyse**

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Anfangsdenaturierung	95°C	10:00 min
2. Denaturierung	95°C	0:15 min
3. Annealing	62°C → 56°C (0,5°C/Zyklus)	0:10 min
4. Elongation	72°C	0:25 min
5. Kühlen	40°C	0:30 min
6. Schmelzkurvenanalyse	95°C	0:00 min
	65°C (0,1°C/s bis 99°C)	0:10 min
	99°C	0:00 min
Schritte 2-4 : 33-43 Zyklen		

**Tab.9a: Standard-PCR-Programm für die qRT-PCR von cDNA aus Formalin-fixierten Geweben**

**Tab.9b: Annealing-Bedingungen aller Primer für die qRT-PCR von cDNA aus Formalin-fixierten Geweben**

Spezifität	Anneling	Temperaturerniedrigung/ Zyklus	Zyklen
18s rRNA, E12/E47, SIP1	62°C → 58°C	0,5°C	37
E-Cadherin, Snai1	65°C → 60°C	0,3°C	43
Snai2, deltaEF1	60°C → 55°C	0,5°C	43
VHL, MMP-2, MMP-9, HIF-1α, HIF-2α, HIF3α4	62°C → 58°C	0,5°C	44
VEGF, WT1, MMP-7, CA-IX	63°C → 58°C	0,5°C	43

Für die absolute qRT-PCR-Analyse von TGF-β1 wurde ein Primer-Set von der Firma Search LC nach Angaben des Herstellers verwendet.

Die Spezifität der PCR-Reaktion lässt sich über eine Analyse des Schmelzpunktes erkennen. Der Schmelzpunkt einer Nukleinsäure ist als die Temperatur definiert, bei der 50 % der DNA als Einzelstrang vorliegen. Zur Bestimmung des Schmelzpunktes wird der Thermoblock von 65°C auf 99°C mit 0,1°C/s aufgeheizt. Dabei wird kontinuierlich die Fluoreszenz der Proben gemessen. Durch Erhitzen wird die dsDNA denaturiert, wodurch das gebundene SYBR-Green frei wird und die Fluoreszenzintensität abnimmt.

Sowohl die Schmelzkurvenanalysen als auch die Festlegung der Kreuzungslinie und somit der CP-Wert wurden mit Hilfe der „Light-CyclerSoftware-v4.05“ durchgeführt.

### 3.6.11 Gelelektrophorese von DNA

Amplifizierte PCR-Produkte wurden bei einer Größe unter 500 bp (Basenpaaren) auf ein 1,7 %-iges Agarosegel mit Ethidiumbromid (7 µl/100 ml) aufgetragen und mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Alle anderen DNA-Fragmente, die eine Größe von 500 bp überschritten, wurden auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. Für die Größenkontrolle der Produkte wurde ein 1kb-plus-Marker (Invitrogen) verwendet. Nach einer Laufzeit von 40-50 min in einer horizontalen Gelapparatur in 1xTAE bei einer Spannung von 100 V wurden die Produktbanden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und dokumentiert.

## 3.7 Molekularbiologische Arbeiten mit RNA

### 3.7.1 RNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen und kryokonserviertem Gewebe

Die zelluläre Gesamt-RNA von Zelllinien und kryokonservierten Gewebeproben wurde mit Hilfe des RNA/DNA/Protein Isolierungs-Reagenz TriReagent® (Sigma) aufgereinigt, das Phenol und Thiocyanat enthält. Für eine RNA-Extraktion aus Zelllinien wurden maximal  $5 \times 10^5$  Zellen in 200 µl Tri Reagent® aufgenommen, bei kryokonserviertem Gewebe wurden 20 Schnitte mit einer Dicke von 10 µm in dem doppeltem Volumen aufgenommen. Bei den weiteren Schritten wurde entsprechend die doppelte Menge an Reagenzien eingesetzt. Zuerst wurden durch Auf- und Abpipettieren die zellulären Plasmamembranen und Organellen aufgeschlossen, um ein homogenes Lysat herzustellen. Die darauf folgende 10-minütige Inkubation führte zur Dissoziation der Nukleoprotein-Komplexe von der RNA. Die Gesamt-RNA wurde extrahiert, indem zu dem Lysat 1/5 Volumen 1-Brom-3-Chlor-Propan hinzugefügt und 15 s gevortext wurde. Nach einer 10-minütigen Inkubation wurde die Suspension 20 min bei 12000 x g und 4°C sedimentiert.

Hierbei bildeten sich drei Phasen: die Proteine enthaltende, organische Phase, die Interphase mit DNA und eine obere, farblose, wässrige Phase, welche die RNA enthielt. Die RNA-enthaltende Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit einem Volumen Isopropanol bei -20°C für mind. 1 h präzipitiert. Durch Zentrifugation (12000 x g, 4°C, 25 min) wurde die RNA anschließend sedimentiert, der Überstand verworfen und mit 500 µl eiskaltem 75 %-igen Ethanol gewaschen. Zuletzt wurde die luftgetrocknete RNA in 20 µl Nuklease-freiem Wasser aufgelöst und bei -80°C gelagert.

### 3.7.2 RNA-Extraktion aus Formalin-fixierten Gewebepräparaten

Die RNA-Extraktion aus Formalin-fixierten, in Paraffin-eingebetteten Gewebepräparaten wurde mit Hilfe des „High Pure RNA Paraffin Kit“ (Roche) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Je Gewebepräparat wurden zwei 10 µm dicke Schnitte verarbeitet und für die cDNA-Synthese eingesetzt.

### 3.7.3 Laser-Mikrodissektion von Formalin-fixierten Gewebepräparaten

#### 3.7.3.1 PALM MicroBeam

In Kooperation mit Dr. Buchner vom LTI der LMU München wurden für die Laser-Mikrodissektion mit dem MicroBeam (Palm) 5 µm dicke Gewebeschnitte auf sterilisierte PEN-Membran-Objektträger (Palm) aufgezogen und über eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert. Um die Gewebestrukturen besser unterscheiden zu können, wurde eine Cresylviolettacetat-Färbung durchgeführt. Dabei wurden die Objektträger 40 s in eine 1 %-ige Cresylviolettacetat-Lösung getaucht und anschließend in 70 % und 100 % Ethanol entfärbt. Unter Verwendung der Software „Palm@Robo-V2.2“ wurde eine Laser-Mikrodissektion mit folgenden Parametern isoliert: UV-Energie: 77-85; UV-Fokus: 80; Lasergeschwindigkeit: 20.

Die anschließende RNA-Extraktion wurde mit dem „Purescript RNA Isolation Kit“ (Gentra) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die isolierte RNA wurde mit dem Bioanalyzer 2100 (Agilent) und dem „RNA 6000 Pico LabChip® Kit“ (Agilent) auf Quantität und Qualität nach Angaben des Herstellers analysiert.

#### 3.7.3.2 Arcturus<sup>XT</sup> PixCell Ile

Die Laser-Mikrodissektion mit dem Arcturus<sup>XT</sup> PixCell Ile-System wurde an der Pathologie der TUM (Prof. Höfler) unter Anleitung von Dr. Weirich durchgeführt. Dazu wurden 5 µm dicke Formalin-fixierte, in Paraffin-eingebettete Gewebeschnitte auf Objektträgern aufgezogen und nach Entparaffinierung über eine absteigende Alkoholreihe in Hämalaun gefärbt. Bei der Mikrodissektion kamen „CapSure® LCM Caps“ (Arcturus<sup>XT</sup>) zum Einsatz, die auf der Unterseite einen Transferfilm haben, der bei Kontakt mit einem Infrarot-Laser-Puls an das ausgeschnittene Gewebe schmilzt. Das Gewebe absorbiert dabei nicht den Laser-Puls und bleibt somit unbeschädigt. Folgende Parameter wurden mit Hilfe der Software „ArcturusXT Operating Software-v2.0“ verwendet: Energie: 60 mW, Dauer: 3,0 ms, Spotgröße: 7,5 µm, Zielenergie: 6. Für die RNA-Extraktion wurde die Transfermembran mit den anhaftenden

Gewebestückchen in Lysepuffer mit Proteinase K über Nacht bei 60°C inkubiert und mittels Standard-Chloroform/Phenol-Extraktion, einschließlich einem enzymatischen Verdau der DNA durch DNase, die RNA isoliert. Die RNA-Ausbeute wurde nach cDNA-Synthese mit einem Haushaltsgen in der qRT-PCR-Analyse überprüft.

### 3.7.4 Herstellung von *ivt*RNA

Die Herstellung von *ivt*RNA diente als Vorlage für die transiente Translation von Proteinen nach dessen Elektroporation in humane Zelllinien. Dazu wurde pDNA mit dem entsprechenden Restriktionsenzym linearisiert, um eine geeignete Vorlage für die *in vitro* Transkription (IVT) herzustellen. Da das Plasmid (pcDNA3.1, Invitrogen) einen T7-Promotor am 5`-Ende der cDNA, die das gewünschte Protein kodierte, enthielt, wurde die Transkription mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase des „mMESSAGE mMACHINE T7 Kits“ (Ambion) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die RNA-Stabilität hängt von einer Cap-Struktur am 5`-Ende und einem Poly(A) - Schwanz am 3`-Ende ab. Die mRNA-Moleküle, die von Zellen produziert werden, besitzen immer einen Poly(A)-Schwanz. In der oben beschriebenen *in vitro* Transkriptionsreaktion wird jedoch nur das Cap-Analogon in die RNA eingebaut. Da der Poly(A)-Schwanz nicht vom Plasmid kodiert wird, wurde die *ivt*RNA im Nachhinein mit Hilfe eines „Poly(A) Tailing Kits“ (Ambion) nach Angaben des Herstellers polyadenyliert. Die anschließende Aufreinigung der *ivt*RNA wurde mit dem „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 3.7.5 Gelelektrophorese von RNA

Die *ivt*RNA-Fragmente wurden unter denaturierenden Bedingungen in einem 1 %-igen Agarosegele bei 5-10 V/cm aufgetrennt. Für die Herstellung des Gels, Laufpuffers und der RNA-Probe wurde ausschließlich DEPC-Wasser verwendet. Die Agarose wurde in dem entsprechenden Volumen TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgelöst und mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die RNA-Lösung (0,5 µg RNA) wurde mit Auftragspuffer („2X RNA Loading Dye“, Fermentas) versetzt und bei 65°C für 10 min denaturiert. Als Größenstandard wurde eine RNA-Leiter (RiboRuler™ High Range RNA Ladder, Fermentas) verwendet.

## 3.8 Transfektion von humanen Zellen

Die Transfektion von humanen Zellen wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden durchgeführt. Zum einen durch Elektroporation und zum anderen mittels des

Lipofektion-basierten Reagenzes „FuGENE<sup>®</sup> HD“ (Roche). Die Elektroporation induziert durch kurze elektrische Pulse eine reversible Permeabilität der Plasmamembranen. Es kommt zur Bildung hydrophiler Poren, da sich die Lipide in der Lipiddoppelschicht anders orientieren. Der genaue molekulare Mechanismus dieses Phänomens ist noch nicht geklärt. Die Anzahl der Poren und ihr Durchmesser nehmen mit Stärke und Dauer des elektrischen Pulses zu. Kleine Moleküle diffundieren durch die Poren ins Zytoplasma der Zelle, größere Moleküle, wie Nukleinsäuren, gelangen durch elektrophoretische Kräfte ins Zellinnere.

### 3.8.1 Stabile Transfektion von DNA

Zur Herstellung von stabil transfizierten Zelllinien wurde der Expressions- oder Reporter-gen-Vektor mittels Elektroporation oder mit dem Reagenz „FuGENE<sup>®</sup> HD“ in die Zellen eingebracht und durch Zugabe eines entsprechenden Antibiotikum zum Kulturmedium ein Selektionsdruck aufgebaut. Für die Elektroporation von Zelllinien wurden ca.  $1 \times 10^6$  Zellen mit 5  $\mu\text{g}$  pDNA in 200  $\mu\text{l}$  OptiMEM<sup>®</sup> (Gibco) in einer Elektroporationsküvette vermischt und in einem exponentiellen Elektroporationsprogramm mit dem „Gene Pulser Xcell<sup>™</sup>“ mit 280 V und 150  $\mu\text{F}$  transfiziert. Nach ca. zwei Wochen Kulturdauer unter Selektionsdruck wurden die selektierten Zellen erneut mit „FuGENE<sup>®</sup> HD“ im Verhältnis 3:2 mit dem Vektor nach Angaben des Herstellers transfiziert. Dies wurde maximal ein weiteres Mal wiederholt.

### 3.8.2 Transiente Transfektion von RNA

Die Transfektion von RCC-26 mit siRNA oder *ivt*RNA wurde, wie unter 3.8.1 beschrieben, mittels Elektroporation durchgeführt. Bei der siRNA wurden 100 nM eines Mixes aus vier verschiedenen siRNAs (siGENOME SMARTpool, Dharmacon) pro Transfektion eingesetzt und bei der *ivt*RNA 20-40  $\mu\text{g}$ . K-562 und MaCa1 wurden ebenfalls wie unter 3.8.1 beschrieben elektroporiert, jedoch anstatt mit 280 V und 150  $\mu\text{F}$  mit 300 V und 300  $\mu\text{F}$ .

## 3.9 Immunfluoreszenz-Mikroskopie von humanen Zellen

Die Immunfluoreszenz-Analyse mit einem „Konfokalen Laser Scanning Mikroskop“ (CLSM) erlaubt neben der quantitativen Bestimmung auch eine örtliche Bestimmung der Proteinexpression in einer morphologisch intakten Zelle. Alle Immunfluoreszenz-Analysen wurden mit Hilfe der Software „LCS“ mit dem konfokalen Laser-Rastermikroskop „TCS SP2“ (Leica) aufgenommen und bearbeitet.

Dazu wurden die in „Lab-Tek<sup>®</sup> Chamber Slide“ (Nunc) kultivierten Zellen mit 4 % ige Paraformaldehyd fixiert und dreimal mit TBS gewaschen. Bei einer intrazellulären Färbung wurde zusätzlich die Zellmembran permeabilisiert (CB-Puffer mit 0,05 % Triton X-100 und 1 µg/ml Phalloidin). Bei allen intrazellulären Färbungen wurde im Weiteren zu den Puffern und Lösungen 0,01 % Triton X-100 gegeben. Nach drei Waschschrritten wurde anschließend mit Blockierpuffer (TBS mit 8 % FKS, 1 % BSA, 2 % human Serum) blockiert. Darauf folgte die Inkubation des Primär-Antikörpers in Blockierpuffer für 1 h. Nach einem Waschschrtritt und erneutem Blockieren wurde der Sekundär-Antikörper im Dunkeln für 50 min inkubiert (Tab.10). Nach einem letzten Waschschrtritt wurden die Objektträger mit „SlowFade<sup>®</sup> Gold antifade reagent“ (Invitrogen), das mit DAPI versetzt war, überschichtet und mit einem Deckgläschen bedeckt. Ein Tag später wurden der Objektträger und das Deckgläschen mit Nagellack versiegelt und analysiert oder bei -20°C aufbewahrt.

**Tab.10: Verwendete Primär- und Sekundär-Ak-Pärchen für die Immunfluoreszenz-Analyse**

Primär-Ak	Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle	Sekundär-Ak	Konjugat	Verdünnung	Bezugsquelle
E-Cadherin	IgG <sub>2B</sub>	1:25	R&D Systems	Ziege-α-Maus-IgG <sub>2B</sub>	Alexa <sup>®</sup> 647	1:500	Invitrogen
N-Cadherin	IgG <sub>1</sub>	1:100	Sigma	Ziege-α-Maus-IgG <sub>1</sub>	Alexa <sup>®</sup> 555	1:500	Invitrogen
β-Catenin	IgG <sub>1</sub>	1:250	Zymed/Invitrogen	Ziege-α-Maus-IgG <sub>1</sub>	Alexa <sup>®</sup> 555	1:500	Invitrogen

### 3.10 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbetechnik erlaubt den chemischen Nachweis von Proteinen in Zellen und Geweben unter weitgehender Schonung der mikroanatomischen Verhältnisse und unter Erhaltung der meisten Protein-Quartär-Strukturen. Für jeden verwendeten Antikörper wurden die optimalen Bedingungen ausgetestet und von Dr. Weirich der Pathologie (TUM) begutachtet und ausgewertet. Zur Anwendung kam die LSAB (Labelled (Strept-)Avidin-Biotin)-Methode. Dabei wird der Primär-Ak durch einen biotinylierten-Sekundär-Ak gebunden, an den wiederum ein Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplex gebunden wird. Unter Zugabe eines Zwei-Komponenten Substrats, bestehend aus dem DAB (Diaminobenzidin)-Chromogen und einem wasserstoffperoxidhaltigen Peroxidase-Puffer, bildet sich ein kontrastreiches braunes Endprodukt am Ort des Zielantigens.

3 µm dicke FFPE (Formalin-fixierte, in Paraffin-eingebettete) -Gewebeschnitte wurden über eine absteigende Alkoholreihe, beginnend mit Xylol, entparaffiniert und eine Epitopdemaskierung über eine von drei verschiedenen Methoden

vorgenommen. Bei der Dampfgerer-Methode wurden die Schnitte 30 min in „Target Retrieval Solution“ (Dako) im vorgeheizten haushaltsüblichen Dampfgerer inkubiert und anschließend 10 min bei RT gekühlt. Für eine Druckkochtopf-Behandlung wurden die Schnitte für 7 min in Citrat Puffer (pH 6) im Druckkochtopf gekocht und bei RT für 10 min gekühlt. Bei einer Protease-Behandlung wurden die Schnitte mit einer Protease-Lösung (5 mg/ml Protease in Tris-Puffer, pH 7,6) für max. 15 min inkubiert. Zur Vermeidung unspezifischer Färbungen wurden die Gewebeschnitte anschließend mit 3-5 % Ziegenerum zur Absättigung unspezifischer Immunglobulin-Bindungsstellen und mit 1-3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur Zerstörung endogener Peroxidaseaktivität vorbehandelt („quenching“). Zusätzlich wurde endogenes Biotin mit Hilfe eines „Biotin-Avidin Blocking Kits“ (Vektor) blockiert, um falsch-positive Hintergrundfärbung durch unspezifische Bindung von Avidin-konjugierter Peroxidase zu vermeiden. Nach ein- bis zweistündiger Inkubation des Primär-Antikörpers in „Antibody Diluent“ (Dako) wurden für die weiteren Schritte zwei unterschiedliche Kits nach Angaben des Herstellers verwendet. Für die E-, N-Cadherin- und Snai1-Färbung wurde die Prozedur mit dem „Vectastain Elite ABC-Peroxidase Kit“ (Vektor) für Maus oder Ratte (bei Snai1) durchgeführt, für alle anderen Färbungen wurde der „Dako REAL™ Detection System (LSAB+)“-Kit (Dako) eingesetzt. Als Chromogen wurden „SIGMAFAST™ 3,3'-Diaminobenzidine“-Tabletten (Sigma) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zuletzt wurden die gefärbten Schnitte mit Hämalaun gefärbt und über eine aufsteigende Alkoholreihe mit Xylol als letzten Schritt dehydriert und mit Pertex (Medite) überschichtet und einem Deckglas bedeckt.

Antikörper	Verdünnung	Epitopdemaskierung	Bezugsquelle
β-Catenin	1:100	Dampfgerer	Zymed
CA-IX	1:50	Protease	R&D
E-Cadherin	1:1500	Druckkochtopf	BD
HIF-2α	1:800	Dampfgerer	Biozol
N-Cadherin	1:2000	Druckkochtopf	BD
NY-ESO-1	1:50	Dampfgerer	Zymed
Snai1	1:3000	Druckkochtopf	intern
VHL	1:50	Dampfgerer	Acris
WT1	1:50	Dampfgerer	Dako

**Tab.11: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie**

### 3.11 Reporter Assay

Regulatorische DNA-Sequenzen, wie z.B. Promotoren, lassen sich mit Hilfe von Reporter-Gen-Analysen untersuchen. Um die Aktivität eines Promotors zu untersuchen, wird ein DNA-Fragment, das den Promotorbereich enthält, vor das

Luciferase-Gen des Reporterplasmids pGL4.14 kloniert. Die Expression des Reportergens verhält sich im eukaryotischen Testsystem proportional zum Aktivierungspotential des klonierten DNA-Fragments. Durch Zugabe eines Substrats (Luciferin) für das Enzym Luciferase kommt es zur Chemilumineszenz, welche an einem Luminometer gemessen wird.

Zur Durchführung des Luciferase Assays wurde der „Luciferase Assay Kit“ (Promega) nach Angaben des Herstellers verwendet. Da mit dem Reporterplasmid stabile Transfektanten hergestellt wurden und somit innerhalb einer Transfektante von einer einheitlichen Kopienanzahl ausgegangen werden konnte, wurde lediglich die Gesamt-Protein-Menge der Lysate bestimmt (siehe 3.5.1.2) und vergleichbare Mengen im Luciferase Assay eingesetzt. Die Chemilumineszenz der Luciferase wurde mit einem „Orion II Microplate Luminometer“ (Berthold Detection Systems) gemessen (Injektion: 50 µl, Verzögerung: 2 s, Messung: 10 s).

### **3.12 Funktionelle Assays**

#### **3.12.1 Spaltwanderungs-Versuch**

Der Spaltwanderungs-Versuch gibt Aufschluss über die Migrationsfähigkeit von Zellen. Dazu wurden 6-Loch-Platten mit Fibronectin (10 µg/ml) beschichtet und die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert. Mit Hilfe einer gelben Pipettenspitze wurde ein Spalt in die Kultur gekratzt und die einwandernden Zellen in einem definierten Ausschnitt mit dem Lichtmikroskop (Zeiss) über zwei Tage beobachtet und mit einer „AxioCam“ (Zeiss) fotografiert. Je nach Versuchsanordnung wurden die Zellen zusätzlich ab dem Tag vor der Spalt-Generierung mit verschiedenen Stimuli (Tab.4) kultiviert.

#### **3.12.2 <sup>51</sup>Chrom-Freisetzungs-Versuch**

Zur Untersuchung der zellvermittelten Lyse (CML, cell mediated lysis) wurde ein Standard-<sup>51</sup>Chrom-Freisetzungs-Versuch durchgeführt. Hierfür wurden die Zielzellen mit radioaktivem Chrom (<sup>51</sup>Cr) markiert, das bei einer Lyse der Zielzelle durch die Effektorzelle in den Überstand freigesetzt wird und somit im Überstand nachgewiesen werden konnte.  $1 \times 10^6$  Zielzellen wurden mit radioaktiv markiertem <sup>51</sup>Cr (200 µCi) 1:30 h inkubiert. Anschließend wurden die Effektorzellen mit je 2000 Zielzellen in verschiedenen Verhältnissen (10:1; 5:1; 2,5:1; 1,25:1) in einer 96-Loch-Rundboden-Platte für 4 h kokultiviert. In der Hälfte des Überstandes (50 µl) wurde die freigesetzte Radioaktivität gemessen. Der Prozentsatz der spezifischen Lyse wurde folgendermaßen berechnet:

---

$$\frac{\text{experimentelle } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}}{\frac{1}{2} \text{ maximale } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}} \times 100$$

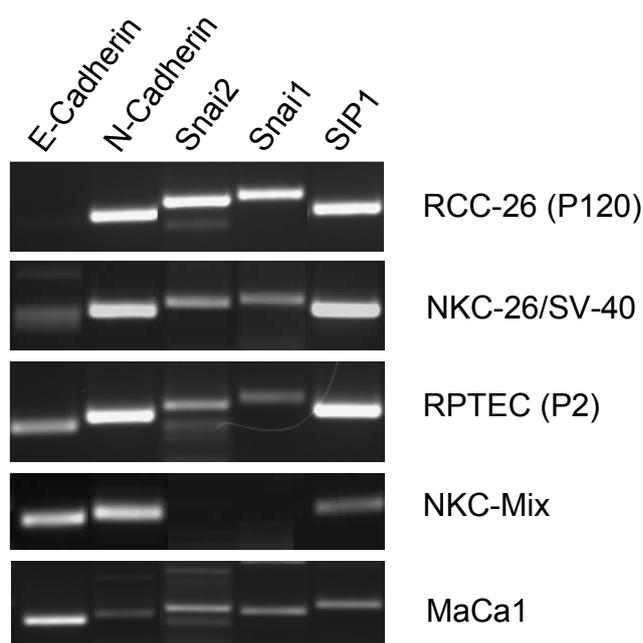
Die spontane  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung ergab sich aus der alleinigen Inkubation der Zielzellen ohne Effektorzellen. Für die maximale  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung wurde das inkorporierte  $^{51}\text{Cr}$  von 2000 markierten Zielzellen direkt gemessen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 EMT-Status von Nierenzellkarzinom-Zellen *in vitro*

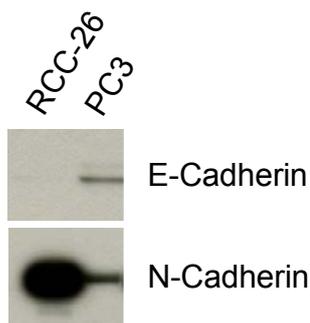
#### 4.1.1 Untersuchungen zur Bestimmung des epithelialen bzw. mesenchymalen Phänotyps

Das Nierenzellkarzinom (RCC) ist wie alle Karzinome epithelialen Ursprungs. Erwartungsgemäß sollten auch RCC-Zelllinien und normale untransformierte Kontrollzellen des gleichen Ursprungs einen epithelialen Phänotyp aufweisen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde deren Phänotyp sowohl auf molekularer Ebene mittels quantitativer „reverse transcription“ -PCR-Analyse untersucht als auch auf Proteinebene im Western-Transfer und die Oberflächenexpression in der FACS-Analyse. Zusätzlich wurden morphologische Unterschiede analysiert. Als Erstes wurde die RNA aus den Zellen von RCC-26, NKC-26/SV-40, RPTEC, MaCa1 sowie ein RNA-Mix aus drei verschiedenen Normalnierengewebeproben (NKC, normal kidney cells) mittels qRT-PCR-Analyse untersucht (siehe 3.7.1, 3.6.9 und 3.6.10) (Abb.6). RCC-26 wurde aus einem klarzelligem RCC (ccRCC) mit dem Tumorgrad G1 etabliert und hat deshalb seinen Ursprung in den proximalen Tubuli der Niere. NKC-26/SV-40 ist eine Zelllinie des gleichen Patienten, aus dem RCC-26 gewonnen wurde, jedoch wurden hier Zellen vom tumorfreien Nierenparenchym mit dem „großen T-Antigen“ von SV40 („Simian virus 40“) transformiert. Die primäre Zelllinie RPTEC („renal proximal tubular epithelial cell“) stammt aus isolierten proximalen Tubuli einer nicht tumorösen Nierengewebeprobe und wurde in „Passage 2“ (ab dem Erhalt von ATCC) eingesetzt. Der RNA-Mix aus Normalnieren wurde aus drei Nieren-



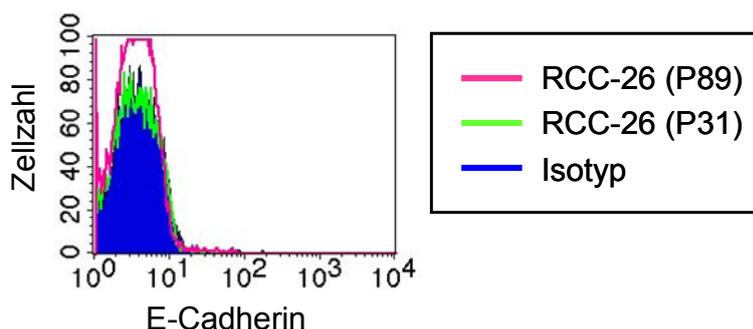
**Abb.6: Epithelialer und mesenchymaler Phänotyp.** Expressionsanalyse von E-, N-Cadherin und E-Cadherin-Repressoren in der qRT-PCR von Karzinom-Zelllinien (RCC-26 und MaCa1), Primär-Zelllinien (RPTEC), transformierten Normalnieren-Zellen (NKC-26/SV-40) und Normalnieren-gewebe (NKC-Mix). Die PCR-Produkte wurden über ein Agarosegel visualisiert.

geweben mittels RNA-Extraktion gewonnen und stellt somit ein Zellgemisch der Niere dar. Als Beispiel für eine epitheliale Zelllinie wurde des Weiteren die Brustkrebszelllinie MaCa1 (Mamma Carcinom 1) verwendet. Die Transkriptanalyse wurde auf die Marker E- und N-Cadherin, sowie die E-Cadherin-Repressoren Snai1, Snai2 und SIP1 begrenzt. E-Cadherin ist ein typischer Marker für den epithelialen Phänotyp, N-Cadherin hingegen sowie Snai1, Snai2 und SIP1, kennzeichnen eher den mesenchymalen Phänotyp. Erstaunlicherweise zeigte die Zelllinie RCC-26 keine E-Cadherin Expression, andererseits aber eine starke Expression für N-Cadherin und die drei E-Cadherin-Repressoren, was für einen mesenchymalen Phänotyp spricht. Bei NKC-26/SV-40 war die Expression von Snai1 und Snai2 reduziert, einhergehend mit einer geringen E-Cadherin Expression. Bei RPTEC, beim NKC-Mix und bei MaCa1 wurde die stärkste E-Cadherin-Expression gefunden, die N-Cadherin-Expression war vor allem bei MaCa1 nur noch sehr schwach ausgebildet und die E-Cadherin-Repressoren kamen entweder nur schwach (MaCa1) oder teilweise gar nicht (NKC-Mix) zur Expression, wodurch der epitheliale Phänotyp gekennzeichnet ist.



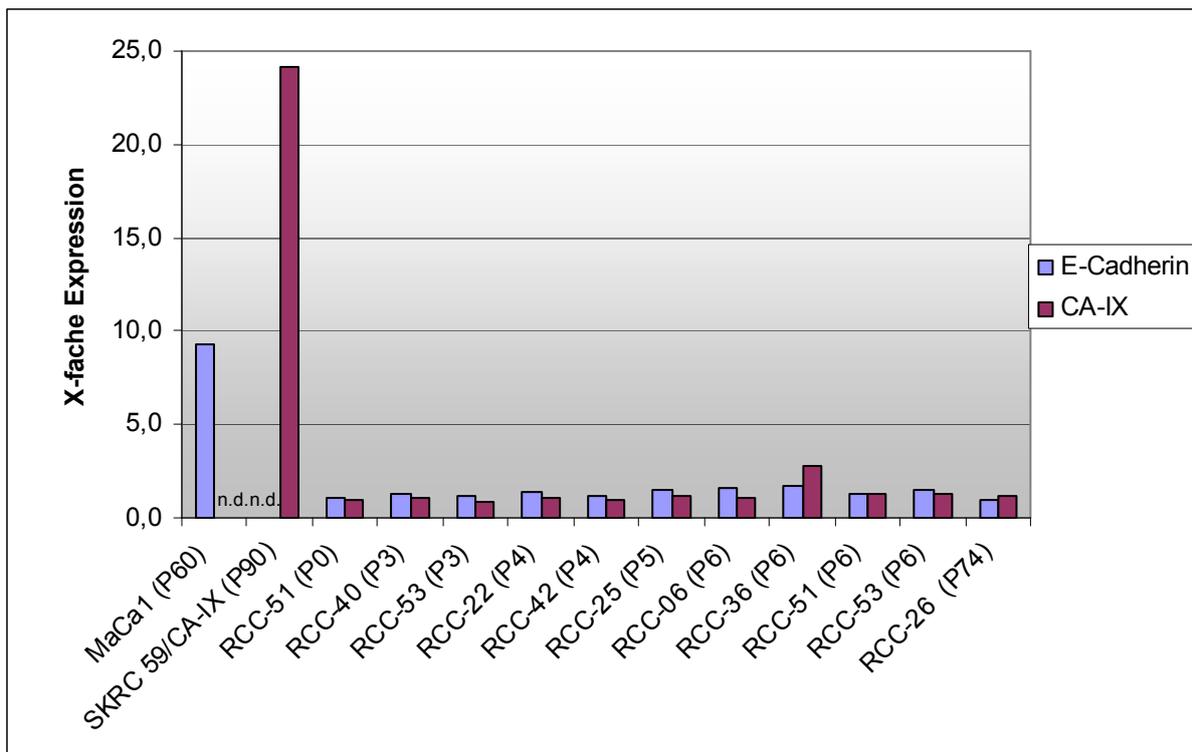
**Abb.7: Proteinexpression von E- und N-Cadherin in RCC-26 und PC3.** Zellysate wurden gelelektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt und im Western-Transfer auf eine Membran transferiert. E- und N-Cadherin wurden mit spezifischen Antikörpern und einem Merrettichperoxidase-markierten Anti-Maus-Antikörper gefärbt.

Um zu überprüfen, ob der mesenchymal-assoziierte Phänotyp von RCC-26 aus den Untersuchungen mittels qRT-PCR-Analyse auch mit der Proteinexpression korreliert, wurde ein Western-Transfer mit E- und N-Cadherin-spezifischen Antikörpern durchgeführt (siehe 3.5) (Abb.7). Die Prostata-Karzinomlinie PC3 diene als Positivkontrolle für E-Cadherin. Auch hier konnte gezeigt werden, dass RCC-26 auf Proteinebene über keine E-Cadherin-Expression verfügt, jedoch eine starke N-Cadherin-Proteinexpression aufweist.



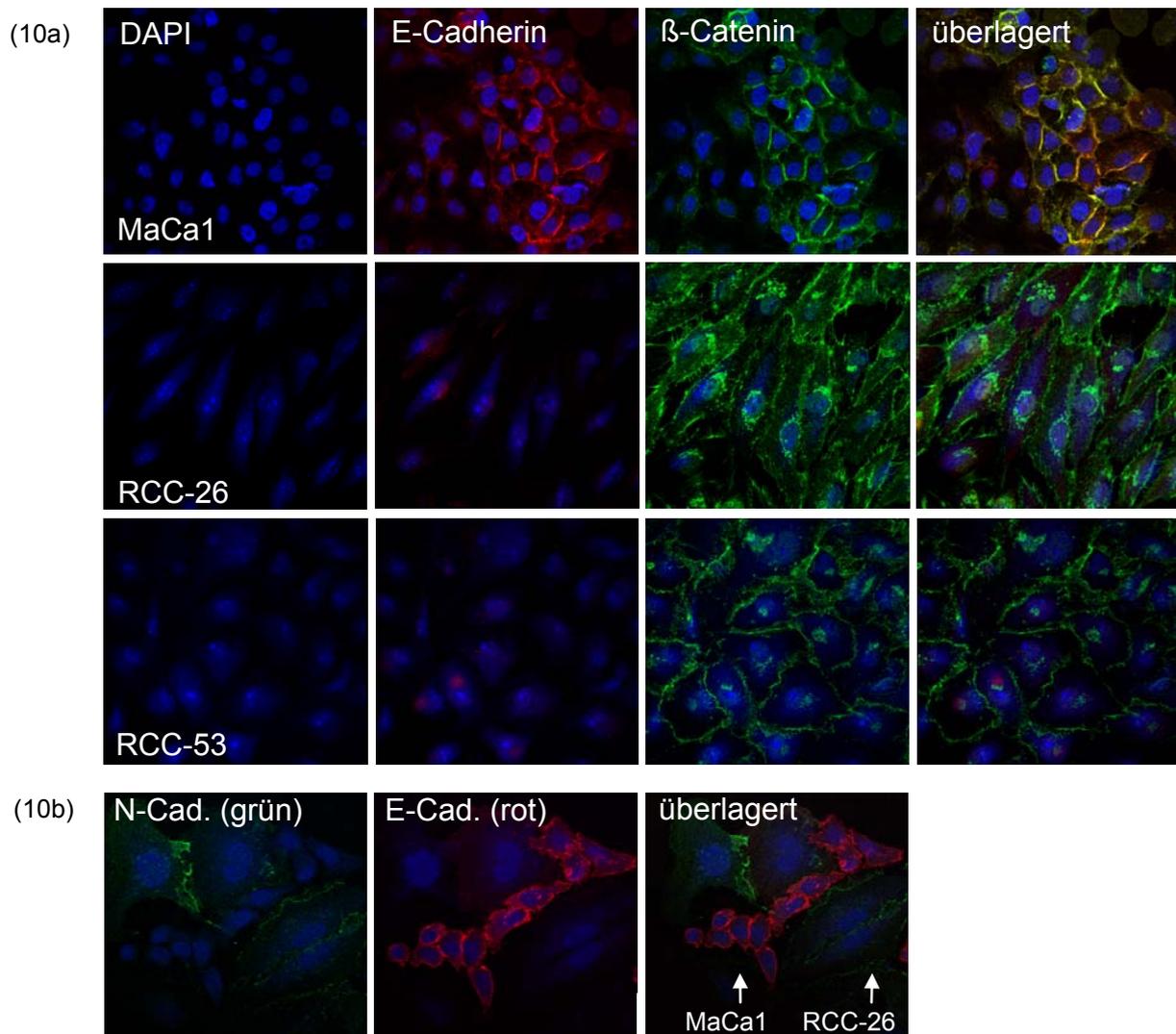
**Abb.8: Vergleich der Oberflächen-E-Cadherin-Expression zwischen einer frühen (P31) und einer späten (P89) Passage von RCC-26.** RCC-26 wurde mit einem spezifischen E-Cadherin-Antikörper und einem PE-markierten anti-Maus-Antikörper gefärbt und mittels FACS analysiert.

Parallel wurde die Oberflächenexpression von E-Cadherin auf RCC-26-Zellen aus zwei verschiedenen Passagen (P31 und P89) mittels FACS-Analyse (siehe 3.2) verglichen (Abb.8). Im Gegensatz zur Positivkontrolle MaCa1 (ohne Abb.) wurde keine Oberflächenexpression für E-Cadherin gefunden. Daraufhin wurde die Oberflächen-Analyse der E-Cadherin-Expression und parallel der CA-IX-Expression auf RCC-Zellen ausgeweitet, die aus verschiedenen Primärtumorgeweben gewonnen und für kurze Zeit in Kultur genommen wurden (Abb.9). Der Hypoxie-Marker CA-IX wird im ccRCC auf den meisten Zellen exprimiert<sup>[184]</sup> und ist bei der intra- und extrazellulären pH-Regulierung beteiligt. Als Positivkontrolle für E-Cadherin wurde MaCa1 und für CA-IX eine stabile CA-IX-Transfektante von SKRC 59 (SKRC 59/CA-IX) eingesetzt. Die kultivierten Primärzellen wurden mit RCC-26 (P74) anhand der X-fachen Expression, basierend auf der MFI (mittlere Fluoreszenz-Intensität), zur Isotyp-Kontrolle verglichen. Nur eine (RCC-36, P6) von den zehn untersuchten kultivierten RCC-Primärzellen zeigte eine schwache Oberflächen-E-Cadherin- und CA-IX-Expression. Diese zeichnete sich zudem durch eine gute Proliferationsrate aus und konnte neben RCC-53 als Linie etabliert werden (ohne Abb.). RCC-26 (P74) war wie alle anderen Zellen für beide Proteine negativ.



**Abb.9: Oberflächenexpression von E-Cadherin und CA-IX von kurzzeit-kultivierten RCC-Primärzellen im Vergleich mit RCC-26 (P74).** RCC-Primärzellen wurden für kurze Zeit in Kultur genommen und die Oberflächenexpression von E-Cadherin und CA-IX in der FACS-Analyse mit RCC-26 (P74) verglichen. MaCa1 diente als Positivkontrolle für die E-Cadherin-Expression, SKRC 59/CA-IX als Positivkontrolle für die CA-IX-Expression. Die X-fache Expression bezeichnet das Verhältnis der E-Cadherin-, bzw. CA-IX-Expression zur ungefärbten Kontrolle, basierend auf der mittleren Fluoreszenz-Intensität (MFI). n.d.: nicht dargestellt

Zur Bestätigung und Erweiterung dieses Ergebnisses wurde die E-Cadherin-Expression von RCC-26 mit einer weiteren RCC-Zelllinie (RCC-53) in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie (siehe 3.9) verglichen, zusammen mit einer Analyse der  $\beta$ -Catenin-Lokalisation (Abb.10a). MaCa1 wurde als Beispiel einer epithelialen Zelllinie mitgeführt. Die starke E-Cadherin-Expression von MaCa1 an der Zellmembran überlagerte mit der  $\beta$ -Catenin-Färbung, was auf den Cadherin-Catenin-Komplex zurückzuführen ist. Sowohl RCC-26 als auch RCC-53, eine Zelllinie, die aus einem klarzelligen RCC mit dem Tumorgrad G3-4 gewonnen wurde, waren E-Cadherin negativ, beide zeigten jedoch eine Membran-assoziierte  $\beta$ -Catenin-Färbung.

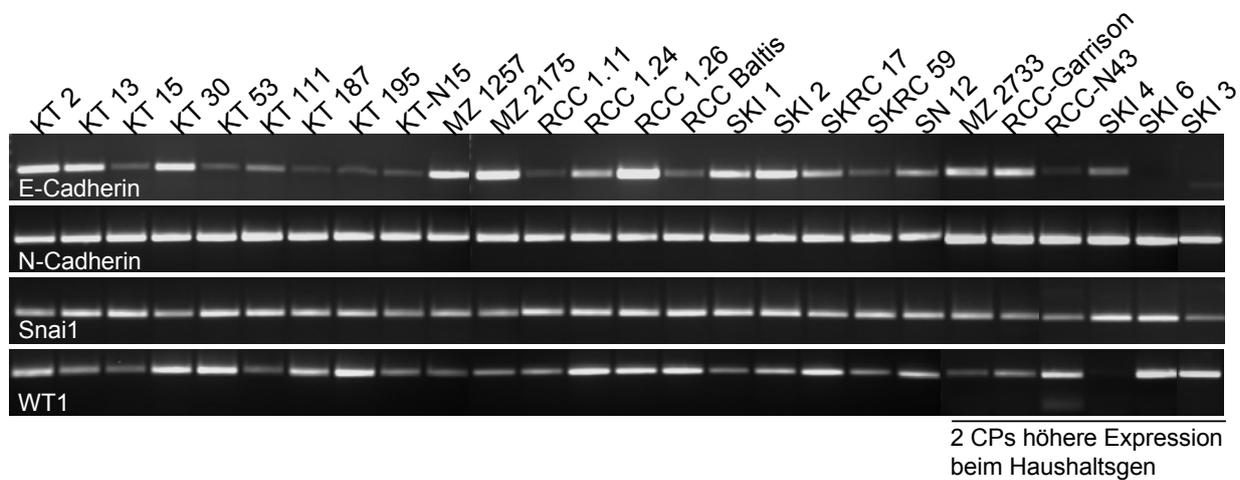


**Abb.10: Vergleich der E-, N-Cadherin- und  $\beta$ -Catenin-Lokalisation zwischen RCC-26/Vektor, RCC-53 und MaCa1.** Die Zellen wurden auf Objektträgern in separaten Kammern kultiviert (a) oder in einer Kammer kokultiviert (b) und anschließend mittels Immunfluoreszenz-Analyse gefärbt. RCC-26 wurde mit einem Leer-Vektor stabil transfiziert.

Zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Phänotypen von RCC-26 und MaCa1 wurden diese auf einem Objektträger in einer Kammer kokultiviert und in einer Doppelfärbung mit Antikörpern gegen N-Cadherin bzw. E-Cadherin gefärbt

(Abb.10b). Nur für RCC-26 konnte eine N-Cadherin-Expression gezeigt werden, MaCa1 dagegen war erwartungsgemäß deutlich E-Cadherin positiv.

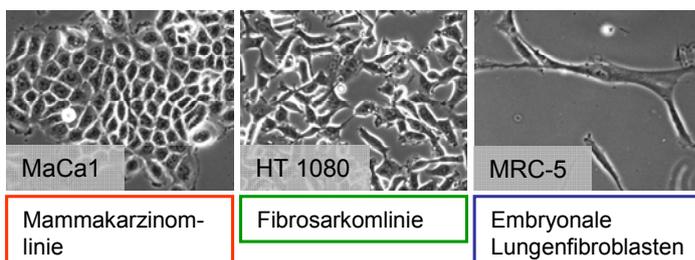
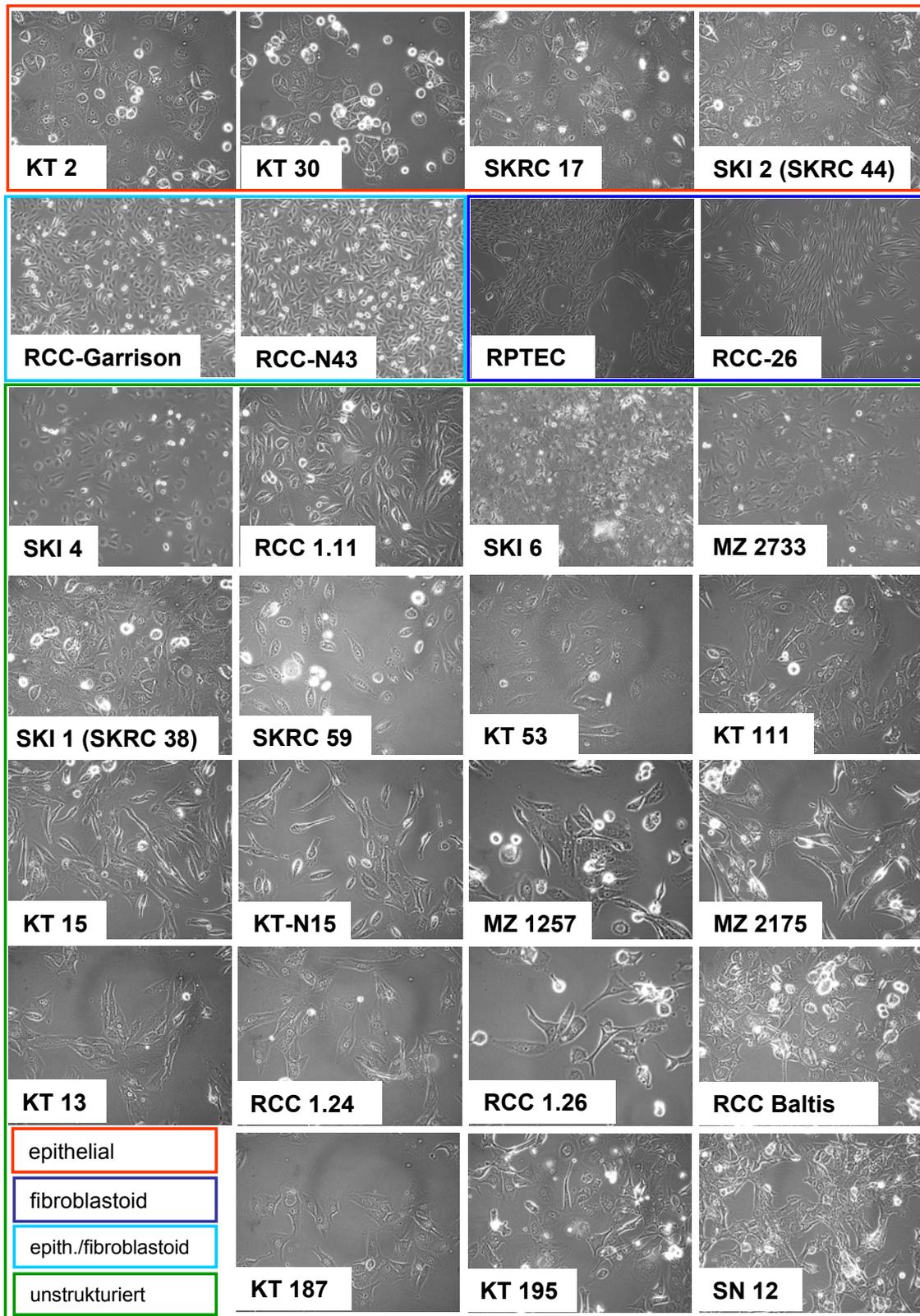
Die beiden untersuchten RCC-Zelllinien zeichneten sich demnach nicht durch einen epithelialen Phänotyp, sondern eher durch einen mesenchymalen oder intermediären Phänotyp aus. Nun stellte sich die Frage, ob es sich hier um eine Besonderheit von diesen beiden Zelllinien handelte, oder ob andere RCC-Zelllinien ein ähnliches Muster zeigen. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden insgesamt 26 RCC-Zelllinien auf die Expression von E-, N-Cadherin, Snai1 und WT1 in der qRT-PCR-Analyse untersucht (Abb.11). WT1 (Wilms Tumor Suppressor-Gen 1) ist ein Transkriptionsfaktor, der die Transkription von E-Cadherin induzieren kann, und fördert somit den epithelialen Phänotyp.



**Abb.11: qRT-PCR-Expressionsanalyse von E-, N-Cadherin, Snai1 und WT1 in 26 RCC-Zelllinien.** Die letzten sechs Zelllinien rechts in der Abbildung hatten eine um 2 Zyklen niedrigeren CP-Wert für das Haushaltsgen. Somit wurde erfahrungsgemäß eine ca. 4-fach höhere cDNA-Konzentration in der qRT-PCR-Analyse eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden über ein Agarosegel visualisiert.

Das Ergebnis sah für E-Cadherin sehr heterogen aus. Manche Zelllinien wie z.B. MZ 2175 und RCC 1.26 zeigten eine sehr hohe E-Cadherin-Expression oder wie KT 30 oder SKI 2 eine zumindest gute Expression für E-Cadherin, während andere sich durch eine geringe bis keine E-Cadherin-Expression auszeichneten, wie z.B. KT 15 und SKI 3. Das Expressionsniveau für N-Cadherin war hingegen für alle Zelllinien durchgehend konstant hoch. Auch bei Snai1 waren nur leichte Schwankungen feststellbar, eine Korrelation zur E-Cadherin-Expression konnte nicht beobachtet werden. Das Gleiche traf auch für WT1 zu. Hier waren die Expressionsunterschiede jedoch etwas deutlicher.

Auch die WT1- und E-Cadherin-Proteinexpressionsanalyse im Western-Transfer von RCC-26, RCC-53 und RPTEC ergab unterschiedliche Ergebnisse (zusätzliche Abb.1). Während RCC-53 als einzige sowohl in der qRT-PCR-Analyse, als auch im Western-Transfer eine WT1-Expression zeigte, aber keine E-Cadherin-Expression,



**Abb.12: Eingruppierung von RCC-Zelllinien und Primärzellen nach morphologischen Unterschieden.** Alle Zelllinien wurden unter Standard-Bedingungen kultiviert und im Durchlichtmikroskop mit einer 20-fachen Vergrößerung fotografiert, bis auf RPTEC und RCC-26, die mit einer 10-fachen Vergrößerung fotografiert wurden.

fehlte RCC-26 und RPTEC die Proteinexpression von WT1, obwohl ein sehr schwaches mRNA („messenger RNA“) -Signal in der qRT-PCR-Analyse zu sehen war. Im nächsten Schritt sollten alle RCC-Zelllinien, inklusive RCC-26 und RPTEC, hinsichtlich ihres morphologischen Phänotyps untersucht werden. Dazu wurden sie unter Standard-Kulturbedingungen kultiviert und im Durchlichtmikroskop fotografiert (Abb.12). Es konnten vier Gruppen gebildet werden. In die erste Gruppe fielen Zelllinien, die eher einen epithelialen „cobblestone“ (kopfsteinpflasterartigen) Phänotyp zeigten (KT 2, KT 30, SKRC 17 und SKI 2). Alle vier Zelllinien zeigten auch E-Cadherin-mRNA-Expression (siehe Abb.11). Als Beispiel für eine epitheliale Morphologie wurde MaCa1 (Abb.12, rechts unten) fotografiert. Die zweite Gruppe bestand aus den beiden Tumorzelllinien RCC-Garrison und RCC-N43 und war gekennzeichnet durch eine Übergangsform vom epithelialen zum tendenziell eher fibroblastoiden Phänotyp. RCC-Garrison war positiv für E-Cadherin in der qRT-PCR-Analyse, RCC-N43 wiederum negativ. Die dritte Gruppe umfasste RCC-26 und RPTEC, die eine spindelzellförmige fibroblastoide Morphologie wie die embryonalen Lungenfibroblasten (MRC-5) besaßen, obwohl RPTEC E-Cadherin exprimierte. Die letzte und größte Gruppe beinhaltete alle anderen Zelllinien, die sich entweder nicht eindeutig einer der bereits genannten Gruppen zuordnen lassen konnten oder eine unregelmäßige Morphologie zeigten, wie die Fibrosarkom-Linie HT 1080. Darunter befanden sich auch Zelllinien, die eine hohe E-Cadherin-Transkriptexpression aufwiesen (siehe Abb.11).

Da die Expressionsergebnisse aus der qRT-PCR-Analyse nicht zwangsläufig mit der Proteinexpression übereinstimmten, wurde die Oberflächen-E-Cadherin-Expression von allen Zelllinien in der FACS-Analyse untersucht (Abb.13). In Abb.13 sind exemplarisch einige Vertreter der drei unterschiedlichen Expressionsniveaus für E-Cadherin dargestellt. MZ 2175, ein Vertreter der E-Cadherin positiven Fraktion, zeigte als einzige aller untersuchten Zelllinien eine geringe Oberflächen-E-Cadherin-Expression. MaCa1 diente als Positivkontrolle. Die Vertreter der zweiten Gruppe KT

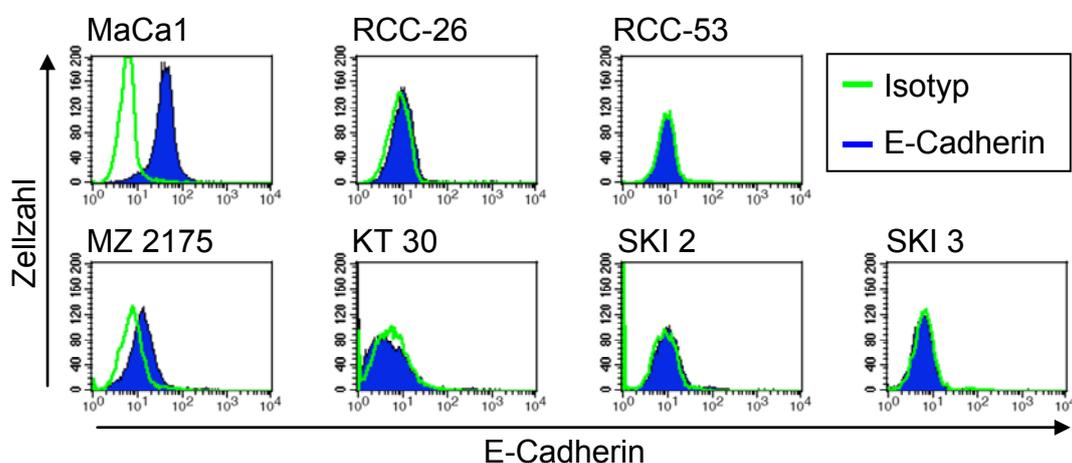
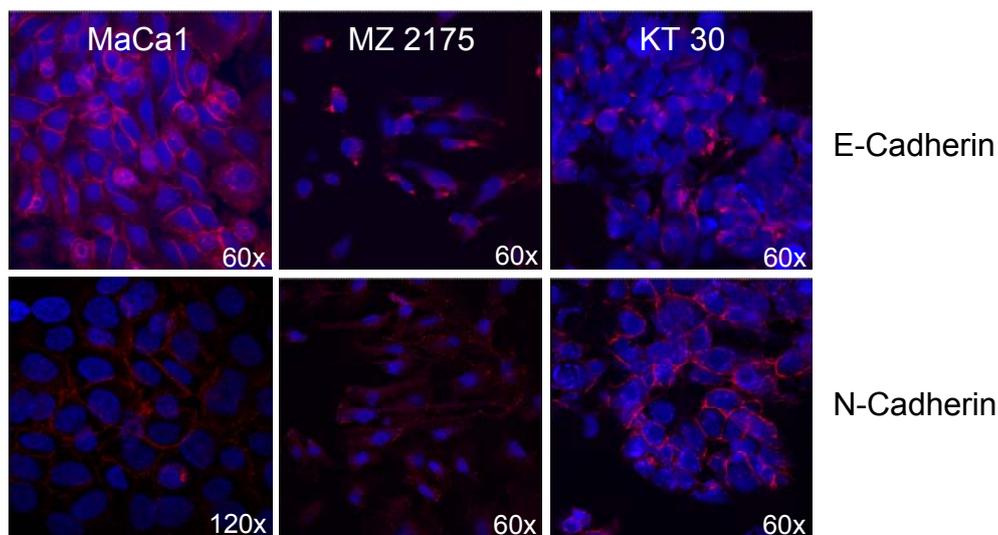


Abb.13: Oberflächen-E-Cadherin-Expression von ausgewählten RCC-Zelllinien.

30 und SKI 2 zeigten keine E-Cadherin-Expression und gehörten zu der Gruppe von Zellen, bei denen eine gute E-Cadherin-Transkriptexpression beobachtet werden konnte. In der letzten Gruppe waren die E-Cadherin-Transkript-negativen Zelllinien, wie SKI 3 sowie RCC-26 und RCC-53, zusammengefasst. Auch hier wurde keine Oberflächenexpression gefunden.

Da bei MZ 2175 E-Cadherin nur gering auf der Oberfläche exprimiert war, wurde die Lokalisation der Proteinexpression genauer untersucht. Bei dieser Analyse wurde die E- und N-Cadherin-Lokalisation von KT 30 und MZ 2175 verglichen (Abb.14). MaCa1 diente wieder als Positivkontrolle. MZ 2175 konnte zwar im Gegensatz zu MaCa1 keine einheitliche Membranlokalisation von E-Cadherin aufweisen, dennoch war eine Proteinexpression fokale verstärkt vorhanden. Ein ähnliches Bild zeichnete sich bei KT 30 ab, wobei hier die E-Cadherin-Expression ungleichmäßig verteilt war. An einigen Stellen gab es eine leichte E-Cadherin-Membran-Färbung, an anderen Stellen war sie fokale verstärkt und wiederum an anderen Stellen nicht vorhanden. KT 30 zeigte allerdings eine deutliche membranständige N-Cadherin-Expression, die auch bei MaCa1 leicht vorhanden war, hingegen kaum bei MZ 2175.

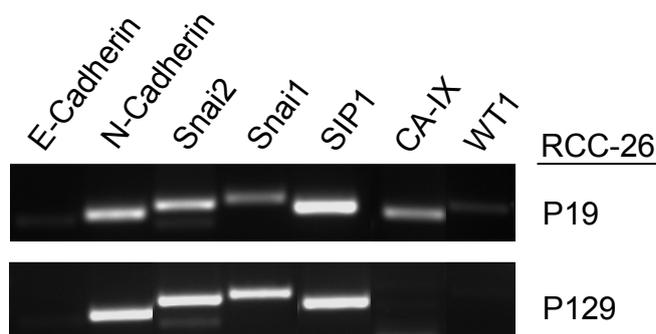


**Abb.14: E- und N-Cadherin Lokalisation in MaCa1, MZ 2175 und KT 30.** Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Alle Bilder wurden mit einer 60-fachen Vergrößerung fotografiert, bis auf die N-Cadherin Färbung bei MaCa1, die mit einer 120-fachen Vergrößerung fotografiert wurde.

#### 4.1.2 Modulation des Phänotyps von RCC-Zelllinien

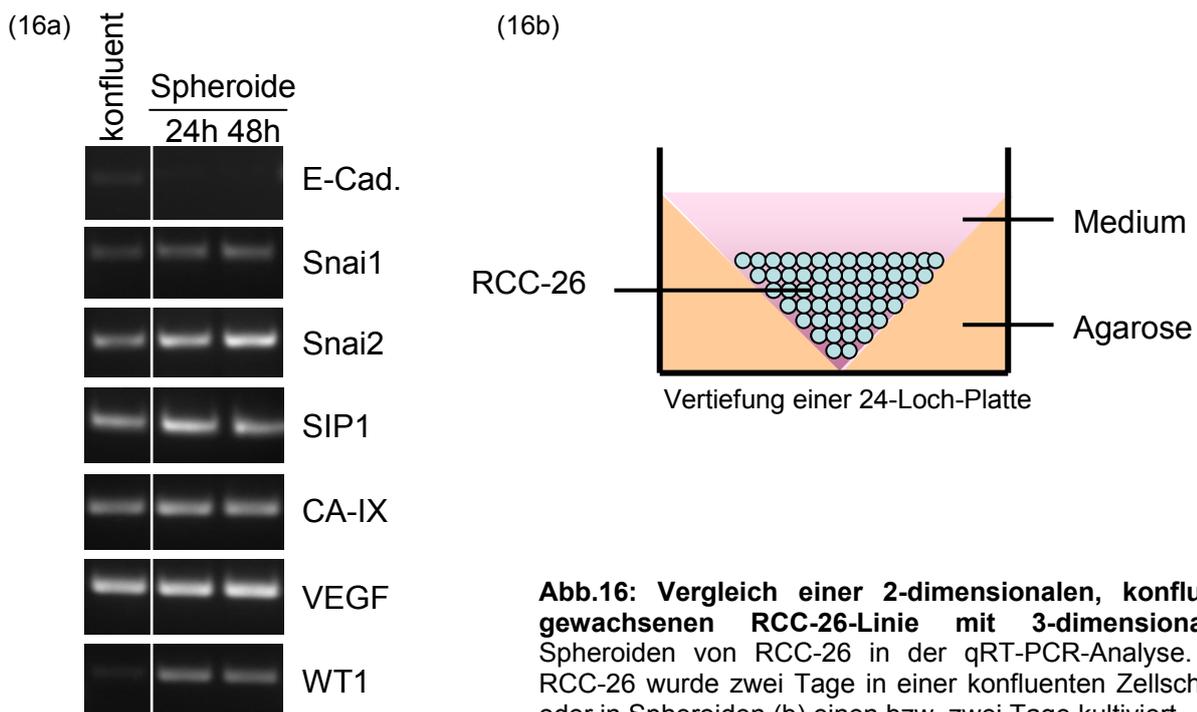
Im vorausgegangenen Kapitel konnte ein sehr heterogener Phänotyp bei den untersuchten RCC-Zelllinien beobachtet werden, wobei sich aufgrund der meist fehlenden Oberflächen-E-Cadherin-Expression eine Tendenz zum mesenchymalen Phänotyp abzeichnete. Somit konnte die Vermutung angestellt werden, dass diese Zelllinien, bedingt durch unterschiedliche Faktoren, sich in einem Stadium der EMT

befinden. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde überprüft, ob die Dauer der Kultivierung einen Einfluss auf den Phänotyp hat. Dazu wurde eine frühe Passage (P19) mit einer älteren Passage (P129) von RCC-26 auf die Expression von E-, N-Cadherin, Snai1, Snai2, SIP1, WT1 und CA-IX in der qRT-PCR-Analyse untersucht (Abb.15). Bei diesem Vergleich konnten einige Unterschiede festgestellt werden. N-Cadherin, Snai1 und Snai2 wurden in der frühen Passage (P19) schwächer exprimiert, was für eine leichte Tendenz in Richtung epithelialer Phänotyp sprach, jedoch war auch hier, in Anlehnung an Abb.8, keine Oberflächen-E-Cadherin-Expression zu finden. Die frühe Passage verfügte im Gegensatz zur Passage 129 noch über eine CA-IX- und eine minimale WT1-Expression.



**Abb.15: Vergleich einer frühen (P19) mit einer späten Passage (P129) von RCC-26 in der qRT-PCR-Analyse.**

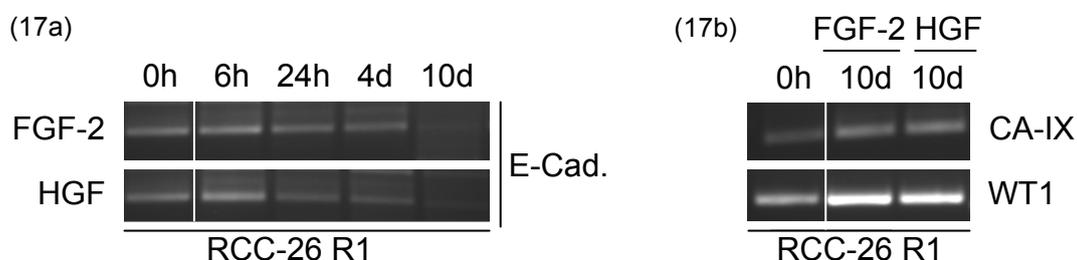
Um *in vitro* die Bedingungen des Tumormilieus hinsichtlich der Zell-Zellkontakte und der 3-dimensionalen (3D) Architektur etwas nachzuahmen, wurden sogenannte Spheroide von RCC-26 kultiviert und mit einer konfluent gewachsenen RCC-26-Linie mittels qRT-PCR verglichen. Spheroide stellen das kleinste 3D-Tumormodell dar und



**Abb.16: Vergleich einer 2-dimensionalen, konfluent gewachsenen RCC-26-Linie mit 3-dimensionalen Spheroide von RCC-26 in der qRT-PCR-Analyse. (a) RCC-26 wurde zwei Tage in einer konfluenten Zellschicht oder in Spheroide (b) einen bzw. zwei Tage kultiviert.**

können zumindest im Zentrum die geringe Sauerstoff-Verfügbarkeit eines Tumors nachstellen. Auch die verstärkte Möglichkeit mit angrenzenden Zellen Zellkontakte auszubilden könnte einen Einfluss auf den Phänotyp von Zellen haben. In der Tat konnten einige Unterschiede zwischen beiden Kulturbedingungen (konfluente bzw. Spheroïd-Kultur) festgestellt werden, wobei die Kultivierungsdauer von einem bzw. zwei Tagen beim Spheroïd-Modell keinen Einfluss hatte. Die E-Cadherin-mRNA-Expression war in beiden Fällen auch hier nicht detektierbar, auch deren Repressoren (Snai1, Snai2 und SIP1) waren nur unmerklich stärker in den Spheroïden exprimiert. Ähnliches galt für die Hypoxie-regulierten Gene CA-IX und VEGF. VEGF ist maßgeblich an der Neovaskularisierung von hypoxischem Gewebe beteiligt. Ein Expressionsunterschied konnte lediglich bei WT1 beobachtet werden (maximal eine 8-fache Transkriptexpressionsdifferenz zwischen beiden Kulturmodellen).

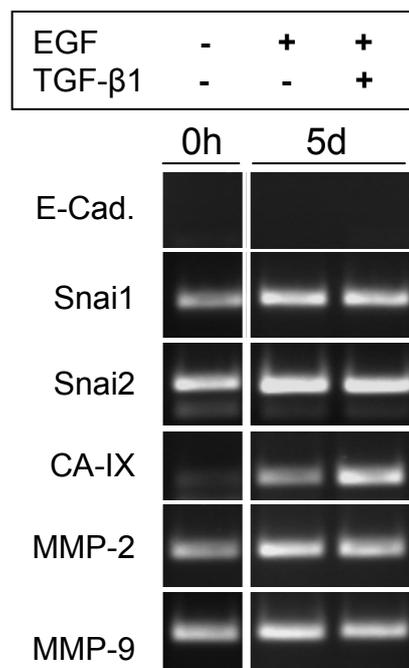
Eine weitere Möglichkeit zur Modulation des Phänotyps besteht in der Stimulation von Zelllinien mit Zytokinen bzw. Wachstumsfaktoren, die im RCC-Tumorgewebe üblicherweise vorliegen. Von diesen Faktoren wird vor allem FGF-2 („fibrblast growth factor 2“ oder auch bFGF, „basic fibrblast growth factor“) und HGF („hepatocyte growth factor“ oder auch SF, „scatter factor“) die Fähigkeit zugeschrieben, eine EMT zu induzieren. Diese kamen bei einer Stimulations-Zeitkinetik von RCC-26 R1 (P64), einem Klon von RCC-26, der über eine geringe E-



**Abb.17: FGF-2- und HGF-Stimulation von RCC-26 R1.** RCC-26 R1 wurde über 10 Tage mit 10 ng/ml FGF-2 oder 20 ng/ml HGF kultiviert. Bei den angegebenen Zeiten wurde die Expression von E-Cadherin (a), CA-IX und WT1 (b) mittels qRT-PCR analysiert.

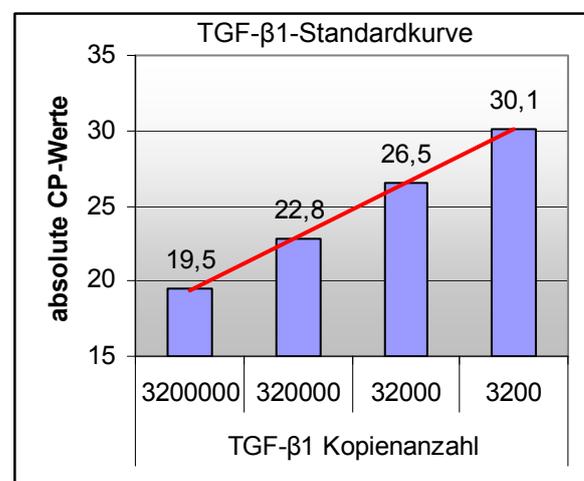
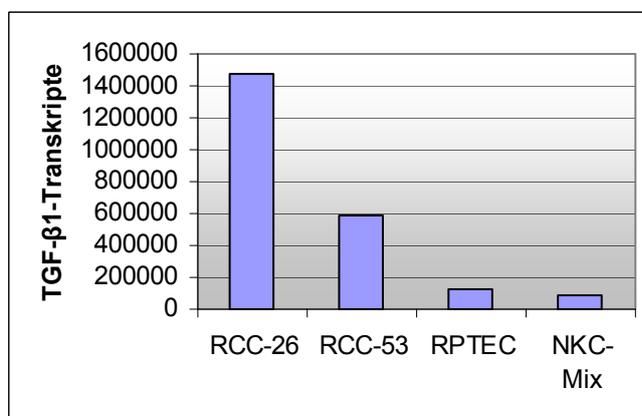
Cadherin-Expression verfügte, zum Einsatz (Abb.17). Sowohl nach FGF-2-Stimulation (10 ng/ml) als auch nach HGF-Stimulation (20 ng/ml) über einen Zeitraum von zehn Tagen, verminderte sich die E-Cadherin-mRNA-Expression bei RCC-26 R1 (Abb.17a). Im Gegenzug kam es, wie bei den Spheroïden, nach zehntägiger Stimulation zu einer leichten CA-IX Expressionssteigerung und einem deutlichen WT1 Anstieg, sowohl nach FGF-2-, als auch nach HGF-Stimulation (Abb.17b). Durch die verstärkte WT1-mRNA-Expression hätte erwartet werden können, dass sich die E-Cadherin-Expression erhöht. Folglich reicht anscheinend aber eine WT1-Expression nicht aus, um die E-Cadherin-Transkription zu erhöhen.

Mit EGF („epidermal growth factor“) und TGF- $\beta$ 1 („transforming growth factor beta 1“) wurden zwei weitere Wachstumsfaktoren im Stimulationsansatz von RCC-26-Zellen über einen Zeitraum von fünf Tagen getestet (Abb.18). EGF war hierbei in der Lage, die Expression von EMT-fördernden Genen zu induzieren. E-Cadherin blieb unverändert negativ, Snai1 und Snai2 wurden etwas stärker exprimiert, ebenfalls die Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9. Auch die CA-IX-Expression erhöhte



**Abb.18: EGF und TGF- $\beta$ 1 Stimulation von RCC-26.** RCC-26 wurde über fünf Tage mit EGF (10 ng/ml) alleine oder zusätzlich mit TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) kultiviert und mittels qRT-PCR analysiert.

sich und konnte zusätzlich durch TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) noch etwas mehr gesteigert werden. Da im Tumormilieu von klarzelligem RCCs häufig eine erhöhte TGF- $\beta$ 1 Konzentration zu finden ist, wurden RCC-26 R1, RCC-53 und RPTEC sowie ein RNA-Mix aus drei tumorfreien Nierengeweben auf TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression unter-

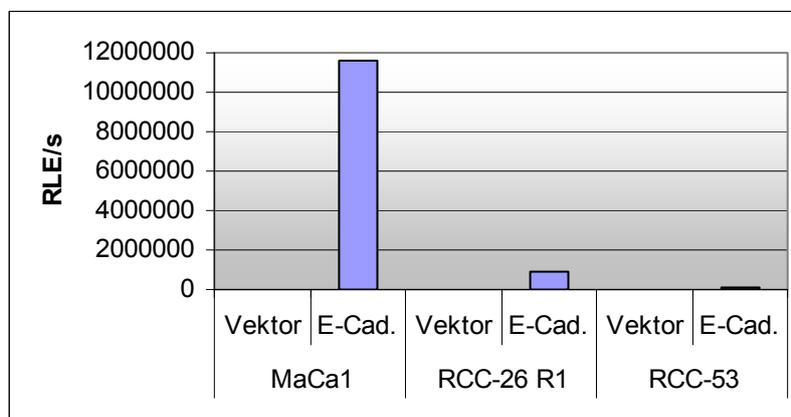


**Abb.19: Absolute TGF- $\beta$ 1 mRNA-Expression.**

RCC-26 R1, RCC-53 und RPTEC wurden unter Standard-Bedingungen kultiviert. Der NKC-Mix bestand aus drei verschiedenen RNAs, die aus kryokonservierten Nierengeweben gewonnen wurden. Dargestellt sind die Anzahl von TGF- $\beta$ 1-mRNA-Molekülen pro 0,5  $\mu$ l cDNA (links), die anhand einer Standardkurve (rechts) ermittelt wurden.

sucht (Abb.19). Mit Hilfe eines Standards konnte die absolute Kopienzahl von TGF- $\beta$ 1 pro 0,5  $\mu$ l cDNA festgestellt werden (siehe 3.6.10). RPTEC und der NKC-Mix exprimierten geringe Mengen an TGF- $\beta$ 1 im Vergleich zu RCC-26 und RCC-53, bei denen eine stark erhöhte Expression gezeigt werden konnte. Nun stellte sich die Frage, ob sich der E-Cadherin-negative Phänotyp von RCC-26 durch eine Neutralisierung von TGF- $\beta$  im Kulturüberstand beeinflussen ließe. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde ein neutralisierender Antikörper gegen verschiedene Isoformen von TGF- $\beta$  dem Medium von RCC-26 zugegeben (25  $\mu$ g/ml pro  $5 \times 10^5$  Zellen) und nach 10 und 24 h die Expression von E-, N-Cadherin, Snai1, Snai2, SIP1, CA-IX und WT1 in der qRT-PCR-Analyse untersucht (zusätzliche Abb.2). Eine Regulation der genannten Moleküle durch die Neutralisierung von TGF- $\beta$  konnte allerdings nicht beobachtet werden, auch nicht nach sieben Tagen Kultivierungsdauer (ohne Abb.).

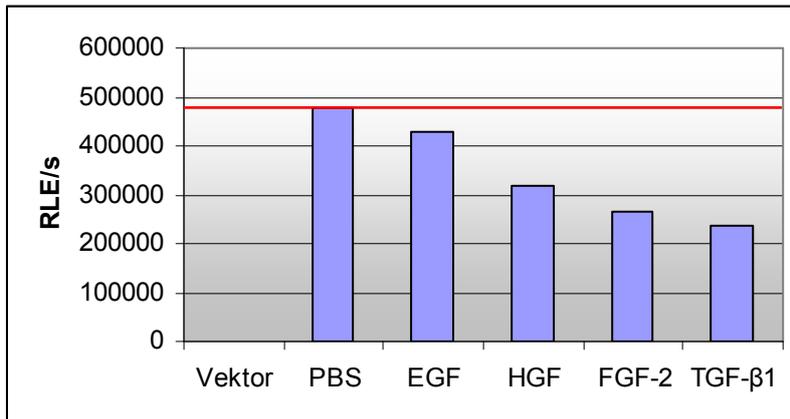
In Abb.17 konnte eine geringe E-Cadherin-Expressionsabnahme bei RCC-26 R1 durch FGF-2 und HGF gezeigt werden. Mit Hilfe eines E-Cadherin-Reporter-Assays wurde dieser Befund überprüft. Dazu wurde der E-Cadherin-Promotor vor das Firefly-Luciferase-Gen kloniert und die Promotor-Aktivität im Luciferase-Assay untersucht. Vorerst sollte noch die grundlegende E-Cadherin-Promotor-Aktivität in MaCa1, RCC-26 R1 und RCC-53 nach stabiler Transfektion des Reporter-Konstrukts gemessen werden (Abb.20). Es ist zu beachten, dass die Transfektionseffizienz in diesem Ver-



**Abb.20: E-Cadherin-Reporter-Assay für drei verschiedene Zelllinien.** MaCa1, RCC-26 R1 und RCC-53 wurden mit einem E-Cadherin-Luciferase-Konstrukt stabil transfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde in relativen Lichteinheiten pro Sekunde (RLE/s) dargestellt.

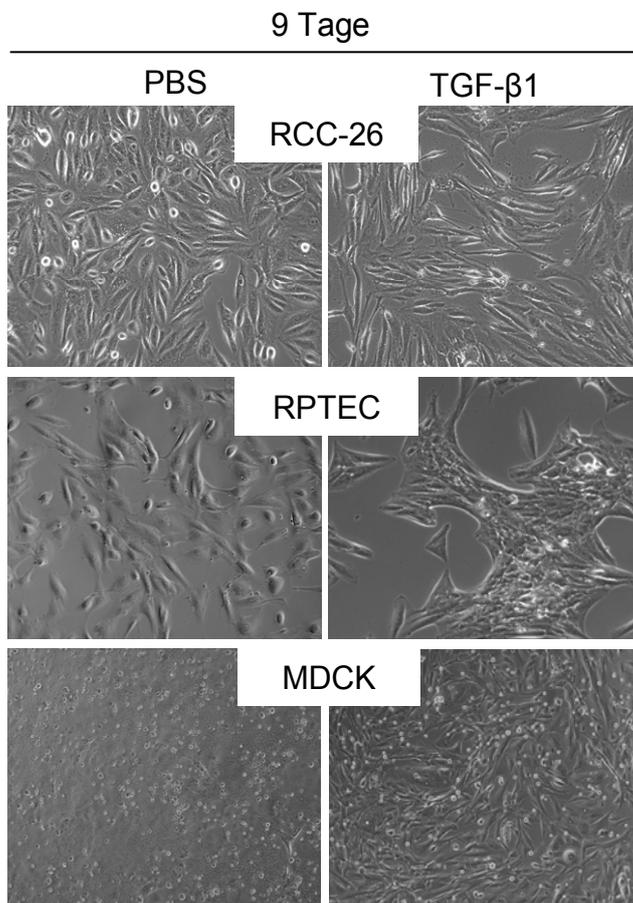
such nicht berücksichtigt wurde. Es konnte aber von verhältnismäßig einheitlichen Niveaus ausgegangen werden, die durch FACS-Analyse der Transfektionseffizienz der jeweiligen Zelllinie mit dem „grün fluoreszierenden Protein“ (GFP) überprüft wurden (ohne Abb.). Die E-Cadherin-Promotor-Aktivität von MaCa1 war um mehr als eine logarithmische Stufe höher als bei RCC-26 R1 und mehr als zwei logarithmische Stufen höher als bei RCC-53.

Des Weiteren sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Wachstumsfaktoren, deren Einfluss auf RCC-26 schon auf mRNA-Ebene analysiert wurde (Abb.17 und



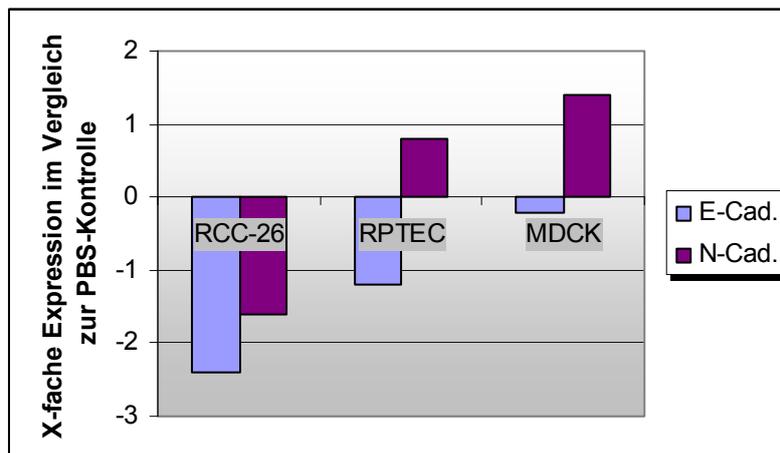
**Abb.21: E-Cadherin-Reporter-Assay nach Stimulation von RCC-26 R1 mit Wachstumsfaktoren.** RCC-26 R1, stabil transfiziert mit einem E-Cadherin-Luciferase-Konstrukt, wurde 1 Tag mit EGF, FGF-2, TGF-β1 (alle 10 ng/ml) oder mit HGF (20 ng/ml) kultiviert. PBS diente als Kontrolle. Luciferase-Aktivität wurde in relativen Lichteinheiten pro Sekunde (RLE/s) dargestellt.

18), die E-Cadherin-Promotor-Aktivität beeinflussen können. Die stabile Transfektante RCC-26 R1 mit dem E-Cadherin-Reporter-Konstrukt wurde einen Tag vor der Stimulation ausgesät und anschließend für einen Tag entweder mit EGF, FGF-2, TGF-β1 (alle 10 ng/ml) oder mit HGF (20 ng/ml) kultiviert (Abb.21). Alle vier Wachstumsfaktoren induzierten eine Verringerung der E-Cadherin-Promotor-Aktivität, wobei TGF-β1 als potentester Kandidat die Luciferase-Expression bis auf die Hälfte herunterregulierte. Danach folgten FGF-2, HGF und EGF in der genannten Reihenfolge. Da TGF-β1 sich als bester E-Cadherin-Repressor unter den getesteten Wachstumsfaktoren herausgestellt hat, konnte auch eine morphologische Veränderung bei Zell-



**Abb.22: Morphologische Veränderungen von RCC-26, RPTEC und MDCK nach neuntägiger Kultivierung mit TGF-β1.** Zellen wurden 9 Tage mit 10 ng/ml TGF-β1 oder mit PBS als Kontrolle kultiviert und anschließend im Durchlichtmikroskop mit einer 10-fachen Vergrößerung fotografiert.

linien durch TGF- $\beta$ 1 vermutet werden. RCC-26, RPTEC und MDCK („Madin-Darby canine kidney cells“), eine RCC-Zelllinie aus den distalen Tubuli eines Hundes mit epithelialem Phänotyp, wurden 9 Tage mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 kultiviert und im Durchlichtmikroskop auf morphologische Veränderungen hin beobachtet (Abb.22). Bei allen untersuchten Zellen konnte ein Übergang zum mehr spindelzellförmigen fibroblastoiden Phänotyp dokumentiert werden. Besonders bei MDCK konnte ein Übergang von einer geordneten epithelialen Einzelzellschicht zu einem ungeordneten Durcheinander von Zellen beobachtet werden, da die Zellen teilweise Zellkontakte verloren und übereinander hinweg wuchsen. Zudem konnte bei RPTEC und RCC-26 ein stark verlangsamtes Wachstum und bei allen eine erhöhte Apoptose-Rate, vor allem in der konfluenten Kultur, festgestellt werden (ohne Abb.). Am fünften Tag der Stimulation wurde eine mRNA-Expressionsanalyse von E- und N-Cadherin durchgeführt (Abb.23). Der größte Unterschied für eine E-Cadherin-

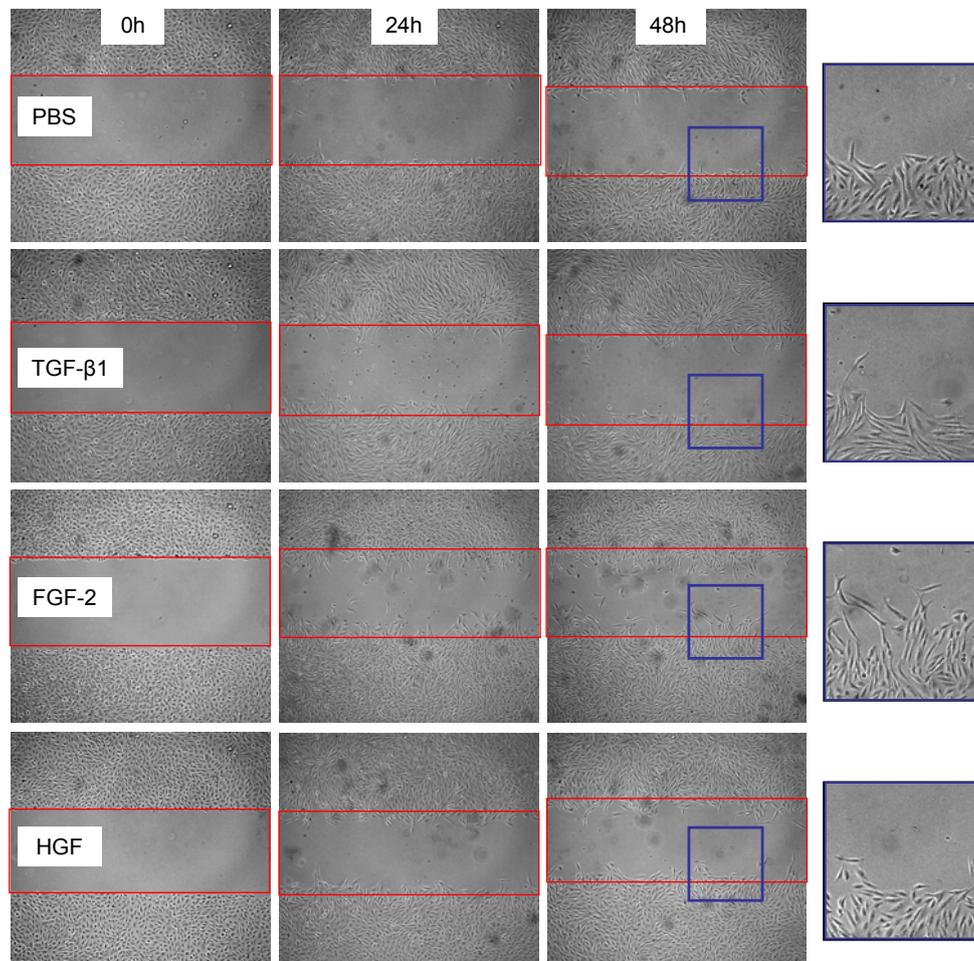


**Abb.23: TGF- $\beta$ 1 Stimulation von RCC-26, RPTEC und MDCK.** Zellen wurden 5 Tage mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 oder mit PBS als Kontrolle kultiviert und anschließend die mRNA-Expression von E- und N-Cadherin untersucht. Expressionsunterschiede wurden in X-facher Expression im Vergleich zur PBS-Kontrolle angegeben.

Transkriptexpression zwischen den TGF- $\beta$ 1-stimulierten Zellen und der PBS-Kontrolle war bei RCC-26 zu sehen. Die Expression ging um gut die zweifache Transkript-Menge zurück. Bei RPTEC war es ca. die Hälfte im Vergleich zu RCC-26. MDCK zeigte keine Veränderung, wies andererseits aber eine gesteigerte N-Cadherin-Expression auf. In RCC-26 dagegen war auch die N-Cadherin-Transkriptexpression verringert.

In den vorangegangenen mRNA-Expressions- und Morphologiestudien konnte den untersuchten Wachstumsfaktoren eine mehr oder weniger starke Modulationsfähigkeit des Phänotyps in die mesenchymale Richtung nachgewiesen werden. Die Veränderung der Zellen in Richtung mesenchymalen Phänotyp geht in der Literatur oft einher mit einer gesteigerten Mobilität und Migrationsfähigkeit der Zellen<sup>[185]</sup>. Ob diese These auch für RCC-26-Zellen zutrifft, wurde in einem Spaltwanderungs-Versuch getestet. Dazu wurde RCC-26 in Fibronectin-beschichtete Kulturschalen ausgesät und am nächsten Tag mit TGF- $\beta$ 1, FGF-2 (beide 10 ng/ml) und HGF (20

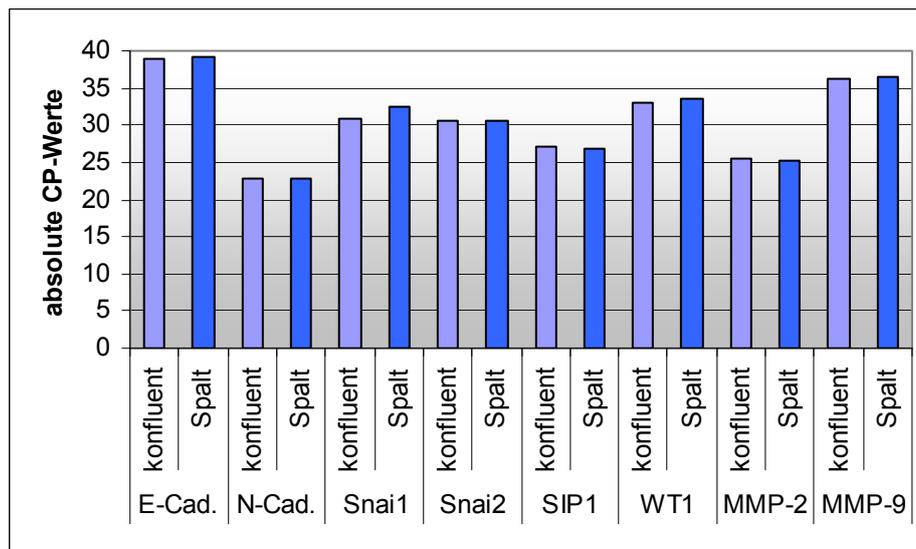
ng/ml) einen Tag lang kultiviert. Danach wurde mit einer Pipettenspitze ein Spalt in die konfluente Zellschicht gekratzt und zwei weitere Tage mit den genannten Wachstumsfaktoren kultiviert (Abb.24). Die verwendeten Bedingungen wurden der aktuellen Literatur entnommen und führten dort bei einigen Zellen zu einer erhöhten Migrationsfähigkeit<sup>[141,186-188]</sup>.



**Abb.24: Spaltwanderungs-Versuch mit RCC-26 nach TGF-β1-, FGF-2- und HGF-Stimulation.** RCC-26 wurde in Fibronectin-beschichtete Kulturschalen ausgesät und am nächsten Tag mit TGF-β1, FGF-2 (beide 10 ng/ml) und HGF (20 ng/ml) einen Tag kultiviert. PBS diente als Kontrolle. Danach wurde mit einer Pipettenspitze ein Spalt in die konfluente Zellschicht gekratzt (0h) und die Kulturschale zwei weitere Tage (24h und 48h) mit Wachstumsfaktoren kultiviert. Das Migrationsverhalten der Zellen konnte im Durchlichtmikroskop dokumentiert werden. Die roten Rechtecke markieren die Spaltgrenzen am Tag 0, die blauen Quadrate kennzeichnen den Ausschnitt der Vergrößerung am rechten Rand.

Betrachtet man in Abb.24 anhand der Vergrößerungen am rechten Rand die Zellen, die nach zwei Tagen in den Spalt gewandert waren, fällt zum einen auf, dass RCC-26-Zellen, ähnlich wie in Abb.22, nach TGF-β1-, aber auch nach FGF-2-Stimulation eine stärker spindelförmige Morphologie annahmen, nicht jedoch, oder weniger, nach Kultivierung mit HGF. Zum anderen waren bevorzugt die FGF-2-stimulierten Zellen in den Spalt gewandert und besaßen somit eine höhere Mobilität, als die übrigen stimulierten RCC-26-Zellen.

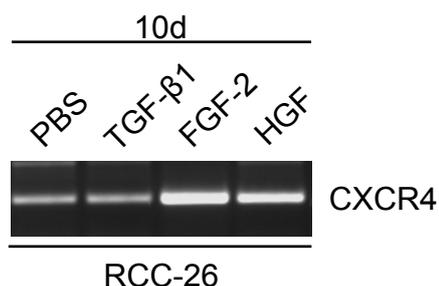
Geht man einen Schritt weiter, stellt sich die Frage, ob diese erhöhte Mobilität eine Eigenschaft ist, die allen stimulierten Zellen zugrunde liegt? Oder schaltet sich bei den Zellen am Spaltrand ein Genexpressionsprogramm ein, das ihnen die Wanderung ermöglicht? Zur Beantwortung dieser Frage wurden Zellen aus dem Spaltwanderungsversuch mittels FGF-2-Stimulation nach zwei Tagen aus dem Spalt isoliert und die mRNA-Expression typischer Gene aus vorangegangenen Versuchen mit konfluent-gewachsenen Zellen verglichen (Abb.25). Dieser Vergleich zeigte aber



**Abb.25: Vergleich zwischen FGF-2 stimulierten RCC-26-Zellen, die in den Spalt eines Spaltwanderungs-Versuch eingewandert sind, mit konfluent-gewachsenen Zellen.** Konfluent-gewachsene Zellen und Zellen, die in den Spalt aus einem Spaltwanderungs-Versuch (Abb.17) mit FGF-2-Kultivierung eingewanderte sind, wurden mit einer Pipettenspitze isoliert. Das mRNA-Expressionsmuster der abgebildeten Gene wurde in absoluten CP-Werten der qRT-PCR dargestellt.

eindeutig, dass die Genexpression von E-, N-Cadherin, Snai1, Snai2, SIP1, WT1, MMP-2 und MMP-9 sich in den beiden Populationen nicht änderte.

Im Hinblick auf die Migration von Zellen wurde zusätzlich die CXCR4-mRNA-Expression von RCC-26 nach zehntägiger TGF- $\beta$ 1-, FGF-2- und HGF-Stimulation untersucht (Abb.26). Der Chemokinrezeptor CXCR4 ist ein Migrationsmarker, der für die gerichteten Wanderung von RCC-Zellen in CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ) -exprimierende Gewebe verantwortlich ist<sup>[118]</sup>. Nach TGF- $\beta$ 1-Stimulation blieb das Expressionsniveau



**Abb.26: CXCR4 mRNA-Expressionsanalyse von RCC-26 nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren.** RCC-26 wurde 10 Tage mit TGF- $\beta$ , FGF-2 (10 ng/ml) oder HGF (20 ng/ml) kultiviert. PBS diente als Kontrolle.

von CXCR4 unverändert, mit HGF wurde eine geringe Steigerung und mit FGF-2 konnte sogar eine hohe Expression von CXCR4 erreicht werden, womit den Zellen zusätzlich zu dem erhöhten Mobilitätspotential auch eine chemotaktische Migrationsfähigkeit zugeschrieben werden kann.

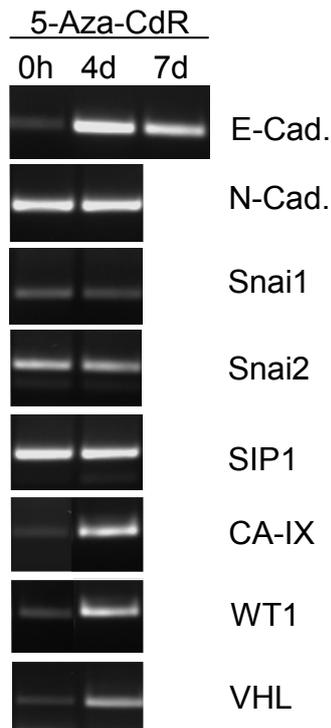
Eine Zusammenfassung der gewonnenen Ergebnisse aus den Spaltwanderungs-Versuchen und Beobachtungen bei der Kultivierung der Zellen ist in Abb.27 zusammengefasst. In dieser Abbildung ist auch ein Cocktail aufgeführt, der aus einer Mischung der Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$ 1, FGF-2 und HGF bestand (ohne Abb.). Nach HGF-Stimulation und bei der PBS-Kontrolle blieb das Wachstumsverhalten der Zellen unbeeinflusst. Im Gegensatz dazu hatte TGF- $\beta$ 1 die größte Wachstums-inhibierende Wirkung und einige Zellen gingen in Apoptose. Da TGF- $\beta$ 1 im Cocktail auch vorhanden war, war hier ein ähnlicher Effekt zu beobachten. FGF-2 und der Cocktail verliehen den Zellen eine erhöhte Mobilität. Zusätzlich zu FGF-2 förderte TGF- $\beta$ 1 einen fibroblastoiden Phänotyp.

	Proliferation	Apoptose	Migration	fibroblastoide Morphologie
PBS	+			
TGF- $\beta$ 1		+		+
FGF-2			+	+
HGF	+			
Cocktail		+	+	

**Abb.27: Zusammenfassung der Einflüsse von Wachstumsfaktoren auf RCC-26.** Die auffälligsten Eigenschaften der eingesetzten Faktoren wurden mit einem „+“ gekennzeichnet. TGF- $\beta$ 1 und FGF-2 wurden in einer Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt, HGF mit 20 ng/ml. Der Cocktail bestand aus allen drei Wachstumsfaktoren in den angegebenen Konzentrationen.

#### 4.1.3 Reexpression von E-Cadherin durch epigenetische Modulation

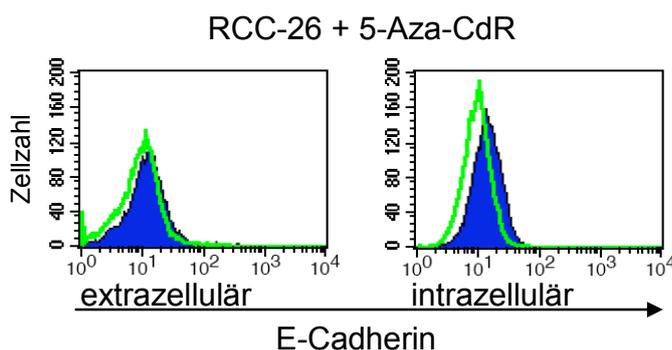
Der Verlust von E-Cadherin kann eine Vielzahl von Ursachen haben. Eine Möglichkeit, die Transkription und Translation von Genen zu regulieren, besteht über epigenetische Modifikationen wie die Promotor-Methylierung oder Histon-Azetylierung. Ein bekannter Mechanismus zur Herunterregulierung von E-Cadherin im RCC ist die Promotor-Hypermethylierung<sup>[189]</sup>. Um diese Transkriptionsbarriere zu überwinden und somit E-Cadherin wieder zur Expression zu bringen, kann man DNA-Methyltransferase-Inhibitoren einsetzen. Dadurch wird eine erneute Methylierung verhindert und die Promotorregion wird wieder zugänglich für den Transkriptionskomplex. Ein bekannter DNA-Methyltransferase-Inhibitor ist 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-CdR). Da eine E-Cadherin-Expression bei RCC-26 sowohl auf RNA- wie auch auf Proteinebene nicht zu finden war, wurde überprüft, ob mit Hilfe dieses Inhibitors eine Reexpression von E-Cadherin induziert werden kann. RCC-26 wurde dazu viermal alle 12 h mit 2  $\mu$ M 5-Aza-CdR stimuliert und für zwei oder fünf weitere Tage kultiviert (Abb.28). Nach vier Tagen ab der ersten Stimulation wurde



**Abb.28: mRNA-Expressionsanalyse nach Promotor-Demethylierung von RCC-26 durch 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-CdR).** RCC-26 wurde 2 Tage mit 2  $\mu$ M 5-Aza-CdR kultiviert. 5-Aza-CdR wurde in 12-Stunden-Intervallen erneuert. Nach dem letzten 12-Stunden-Intervall wurde 5-Aza-CdR ausgewaschen und für weitere 2 Tage (4d) oder 5 Tage (7d) kultiviert.

erstmal eine starke mRNA-E-Cadherin-Expression erreicht, die nach sieben Tagen noch deutlich vorhanden war. Zusätzlich wurde die mRNA-Expression von N-Cadherin, Snai1, Snai2, SIP1, CA-IX, WT1 und VHL (von Hippel-Lindau Gen) untersucht. Das VHL-Gen ist in 19 % der sporadischen klarzelligen RCC hypermethyliert<sup>[20]</sup> und häufig durch Mutationen inaktiviert. Das VHL-Protein fungiert als Teil eines Ubiquitin-Ligase-Komplexes bei der Degradation von den Hypoxie-regulierten Transkriptionsfaktoren HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$ . Bei einer VHL-Inaktivierung wird ein künstlicher Hypoxiezustand erzeugt, wodurch eine große Palette an Hypoxie-induzierten Genen durch HIF-1 $\alpha$  und -2 $\alpha$  aktiviert wird.

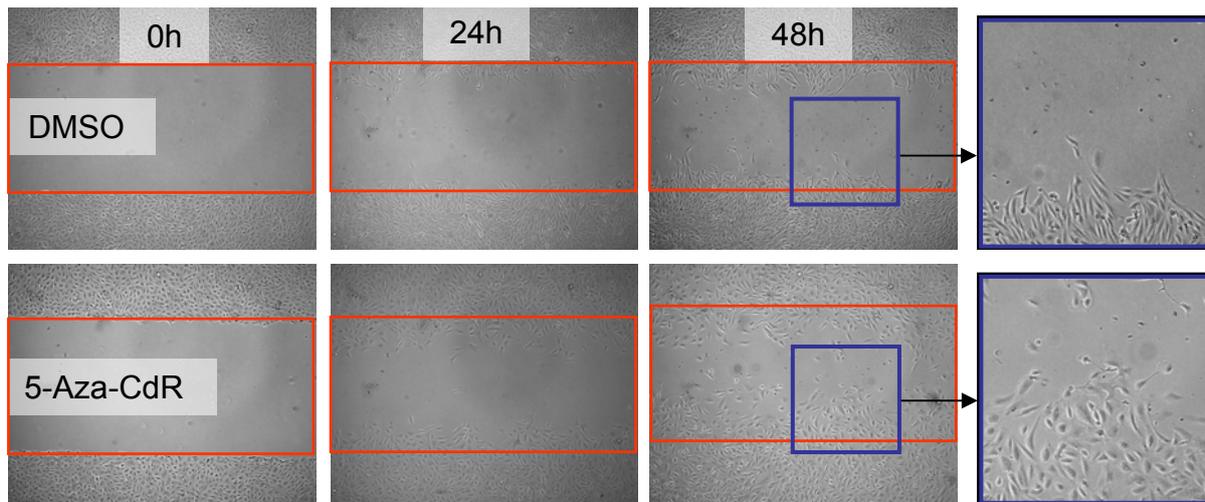
Die Promotor-Demethylierung von RCC-26 ergab keine Expressionsunterschiede für N-Cadherin, Snai1, Snai2 und SIP1. CA-IX, WT1 und VHL konnten andererseits zur Reexpression gebracht werden. Die Reexpression von E-Cadherin wurde auch nach sechs Tagen ab der ersten Behandlung mit 5-Aza-CdR in der FACS-Analyse überprüft (Abb.29). Bei der Oberflächenexpression konnte im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle keine E-Cadherin-Zunahme beobachtet werden, intrazellulär



**Abb.29: Oberflächen- und intrazelluläre E-Cadherin-Expression nach Promotor-Demethylierung von RCC-26 durch 5-Aza-CdR.** RCC-26 wurde wie in Abb.28 kultiviert und nach 6 Tagen ab der ersten Behandlung mit 5-Aza-CdR die E-Cadherin-Expression in der FACS-Analyse untersucht. Die grüne Kurve repräsentiert die unstimulierte Kontrolle.

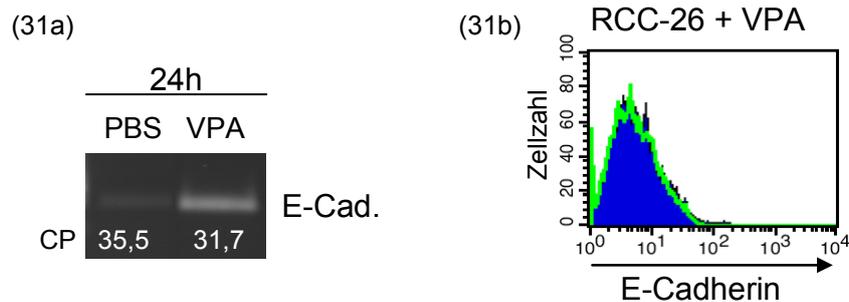
jedoch wurde eine geringe Expression vorgefunden. Möglicherweise verhindern andere Faktoren eine effiziente E-Cadherin-Expression auf der Zelloberfläche.

Da eine Promotor-Demethylierung das Transkriptom einer Zelle wesentlich beeinflusst, wurde auch deren Einfluss auf die Migration untersucht. In einem Spaltwanderungs-Versuch wurde RCC-26 wie in Abb.28 mit 5-Aza-CdR stimuliert und am vierten Tag nach der ersten Stimulation ein Spalt in die Kultur gekratzt (Abb.30). Beobachtete man die einwandernden Zellen, so fiel bei den mit 5-Aza-CdR



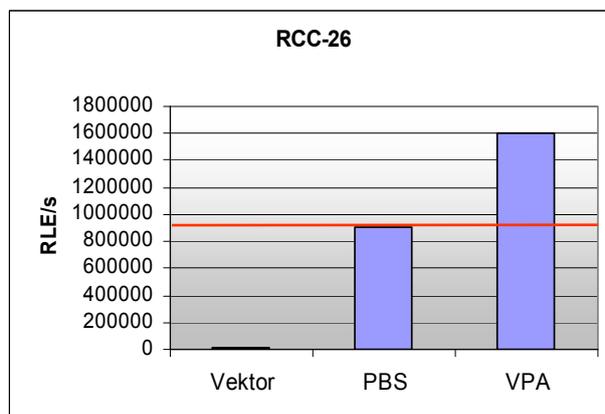
**Abb.30: Spaltwanderungs-Versuch mit RCC-26 nach Promotor-Demethylierung.** RCC-26 wurde in Fibronectin-beschichtete Kulturschalen ausgesät und nach dem Stimulations-Protokoll aus Abb.28 kultiviert. Am vierten Tag nach der ersten Stimulation wurde ein Spalt in die konfluente Kultur gekratzt und die einwandernden Zellen fotografiert. Die roten Rechtecke markieren die Spaltgrenzen am Tag 0, die blauen Quadrate kennzeichnen den Ausschnitt der Vergrößerung am rechten Rand.

behandelten Zellen zum einen eine rundlichere Morphologie auf und zum anderen waren deutlich mehr Zellen in den Spalt eingewandert, als bei der DMSO-Kontrolle. Die E-Cadherin-Transkriptexpression reichte somit nicht aus, um die Zellen durch Ausbildung von Zellkontakten vom Wandern abzuhalten. Es ist aber dennoch zu beachten, dass es sich um eine unspezifische epigenetische Modulation handelte, dessen Auswirkungen im Rahmen dieser Arbeit nicht umfassend untersucht wurden. Eine andere Möglichkeit, eine Reexpression von E-Cadherin über epigenetische Modifikation zu erreichen, ist die Histon-Azetylierung. Diesen Effekt erreicht man z.B. mit Valproinsäure (VPA), ein Inhibitor der Histon-Deacetylase 1 (HDAC1). Dadurch kann ebenfalls eine verstärkte Transkription von Genen induziert werden. Auch der Einfluss von VPA auf die E-Cadherin-Expression bei RCC-26 wurde untersucht. Nach eintägiger Stimulation mit 1,5 mM VPA konnte auch hier eine, allerdings nur leicht verstärkte, mRNA-Expression von E-Cadherin erreicht werden (Abb.31a), eine Oberflächenexpression war jedoch nicht zu erkennen (Abb.31b).



**Abb.31: E-Cadherin mRNA-Expressions- und FACS-Analyse von RCC-26 nach Histon-Acetylierung durch Valproinsäure (VPA).** RCC-26 wurde 24 h mit VPA (1,5 mM) kultiviert und in der qRT-PCR-Analyse mit der PBS-Kontrolle verglichen (a). Absolute CP-Werte sind unter den Agarosegel-Banden aufgeführt. Die VPA-stimulierten Zellen wurden zugleich auf die Oberflächenexpression von E-Cadherin untersucht (b).

Ein direkter Einfluss von VPA auf den E-Cadherin-Promotor wurde im E-Cadherin-Reporter-Assay bestätigt. Die stabile RCC-26-Transfektante mit dem E-Cadherin-Reporter-Konstrukt wurde mit 1,5 mM VPA für einen Tag stimuliert und mit der PBS-Kontrolle verglichen (Abb.32). Durch diese Behandlung konnte die Transkription um knapp die Hälfte gesteigert werden. Bei den E-Cadherin-Reporter-Konstrukt-Transfektanten von MaCa1 und RCC-53 konnte nach gleicher VPA-Stimulation auch eine Steigerung der Promotor-Aktivität von E-Cadherin erreicht werden, jedoch bei MaCa1 nur geringfügig, da anscheinend die basale Transkriptionsrate schon sehr „ausgereizt“ war (zusätzliche Abb.3).

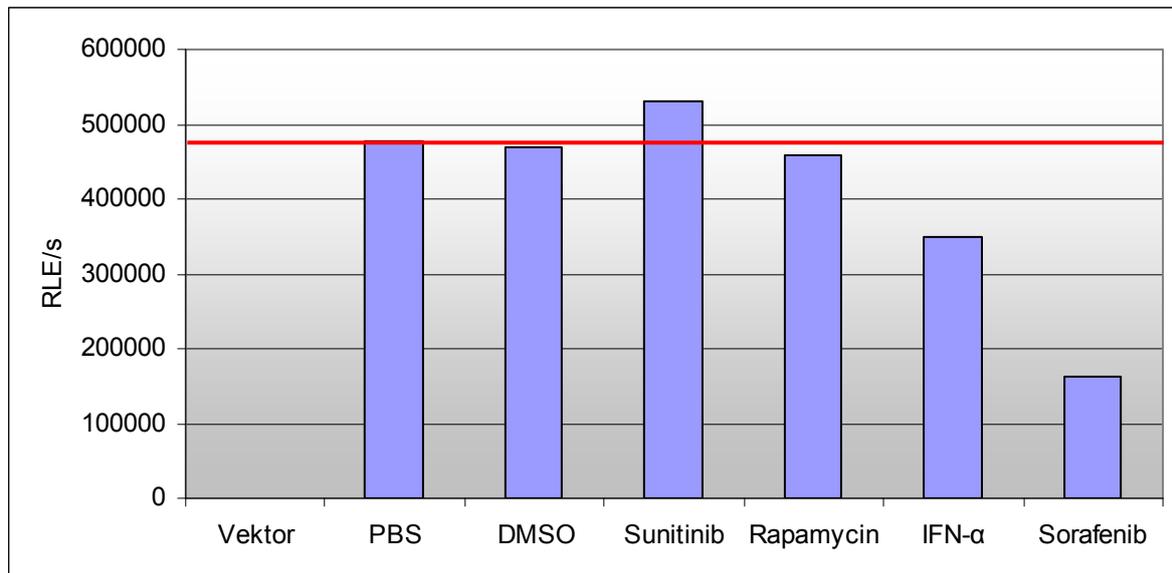


**Abb.32: E-Cadherin-Reporter-Assay von RCC-26-Zellen nach VPA-Stimulation.** Der Assay wurde wie in Abb.20 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurden die Zellen mit 1,5 mM VPA einen Tag vorher stimuliert. RLE/s: relative Lichteinheiten pro Sekunde

#### 4.1.4 Der Einfluss von IFN- $\alpha$ , Multi-Kinase- und mTOR-Inhibitoren auf die E-Cadherin-Expression

Der Angriffspunkt von neuen Therapie-Ansätzen des RCCs stellen häufig Hypoxie-regulierte Gene dar, wodurch unter anderem eine verminderte Vaskularisierung des Tumors erreicht werden soll und somit eine Verhinderung der weiteren Expansion bzw. eine Rückbildung des Tumors. Fraglich ist jedoch, ob eine Metastasierung durch Beeinflussung der E-Cadherin-Expression verhindert werden kann. Unter

diesem Aspekt wurden sowohl Sunitinib und Sorafenib, zwei Multi-Kinase-Inhibitoren, als auch Rapamycin, ein spezifischer mTOR-Inhibitor, und IFN- $\alpha$  im E-Cadherin-Reporter-Assay auf ihre Promotor-aktivierende Funktion hin untersucht (Abb.33). Alle verwendeten Konzentrationen wurden in Anlehnung an die aktuelle Literatur gewählt<sup>[190-194]</sup>. Sunitinib und Rapamycin verhielten sich ähnlich wie die DMSO-Kon-



**Abb.33: E-Cadherin-Promotor-Assay von RCC-26 mit RCC-Therapeutika.** Die stabile RCC-26-Transfektante mit dem E-Cadherin-Reporter-Konstrukt wurde ein Tag vor Stimulation ausgesät und 24 h mit Sunitinib, Rapamycin (beide 20 nM), Sorafenib (15  $\mu$ M) und IFN- $\alpha$  (1000 IU/ml) kultiviert. RLE/s: relative Lichteinheiten pro Sekunde

trolle, bei IFN- $\alpha$  hingegen verringerte sich die Promotor-Aktivität im Vergleich zur PBS-Kontrolle und bei Sorafenib fiel sie bis unter die Hälfte der Kontrolle ab. Retinsäure ist ein weiterer Kandidat, der bei der Therapie des RCC eingesetzt wird, um die Wirkung einer Chemotherapie zu verstärken. Eine Stimulation von RCC-26 mit 2  $\mu$ M Retinsäure erbrachte sowohl nach einem als auch nach fünf Tagen keine E-Cadherin-mRNA-Expressionsveränderung (ohne Abb.).

## 4.2 In situ Untersuchungen zur EMT

### 4.2.1 Expression von EMT-Markern in vier verschiedenen RCC-Subtypen

In den zurückliegenden Kapiteln wurde die Expression von EMT-assoziierten Genen hauptsächlich an Zelllinien untersucht. Wie bereits erwähnt wurde, könnte sich unter Kulturbedingungen das Transkriptom einer Zelle verändern, um sich den neuen Bedingungen anzupassen. Als ein Unterschied wurde z.B. der Übergang von einer dreidimensionalen zur zweidimensionalen Kultur erwähnt oder die Verfügbarkeit von

Sauerstoff. Möglicherweise fehlt auch ein gewisser Selektionsdruck, wie z.B. die Eliminierung von Zellen mit neuen Mutationen oder Expressionsmustern durch Tumor-infiltrierende Lymphozyten<sup>[195,196]</sup>. Eine Reihe von Gründen spricht für die Untersuchung des EMT-Status im Tumorgewebe der Niere. Um einen Überblick über eine mögliche EMT im RCC zu bekommen, wurden vier verschiedene RCC-Subtypen auf die mRNA-Expression von einigen EMT-Markern, inklusive CA-IX, als Marker für das klarzellige RCC, analysiert. Für diese Transkriptomanalyse stellte die Pathologie der TUM (Prof. Dr. Höfler) von 36 RCC-Patienten unterschiedlichen Subtyps jeweils Tumor- und korrespondierendes Normalnierengewebe in Form von kryopräservierten Proben zur Verfügung. Eine Einteilung in den jeweiligen Tumorsubtyp und den Grad der Differenzierung (G1-4) erfolgte durch den Pathologen Dr. Weirich anhand eines HE (Hämatoxylin-Eosin) -gefärbten Gewebeschnittes. Dieser wurde sowohl am Anfang als auch am Ende jeder Schnittserie für die RNA-Extraktion angefertigt. Insgesamt wurden acht renale Onkozytome (RO), zwei chromophobe RCCs (chRCC), sechs klarzellige RCCs mit dem Tumorgrad G1, zehn mit G3-4 und zehn papilläre RCCs (pRCC) im Vergleich zum Normalnierengewebe analysiert (Abb.34). Die CA-IX-Expression diente zur Überprüfung der unterschiedlichen RCC-Subtypen. Während das ccRCC und pRCC CA-IX exprimieren (> 85 % beim ccRCC), sind Patienten mit Onkozytom und chRCC CA-IX-negativ<sup>[40,197]</sup>. Dieses Muster konnte bei den untersuchten Tumorsubtypen bestätigt werden. Die E-Cadherin-Expression verhielt sich bis auf die klarzelligen G1-Tumoren gegenläufig zur CA-IX-Expression. Während das Onkozytom, das chromophobe und das klarzellige RCC mit dem Tumorgrad G1 eine starke Expression zeigten, war im ccRCC mit dem Tumorgrad G3-4 und im pRCC, den beiden RCCs mit der schlechtesten Prognose, die Expression von E-Cadherin überwiegend schwach. Wiederum im fast umgekehrten Verhältnis wurde N-Cadherin exprimiert, mit der Ausnahme von den klarzelligen G1-Tumoren. Diesmal war die Expression von N-Cadherin im Onkozytom und chRCC herunterreguliert im Vergleich zum Kontrollgewebe und in allen anderen Tumorsubtypen überwiegend hochreguliert. Für die E-Cadherin-Repressoren konnte keine eindeutige Einteilung gemacht werden. Snai1 wurde durchgehend sehr schwach exprimiert, für Snai2 und SIP1 konnten im Onkozytom kaum Unterschiede zwischen Tumor und Normalniere beobachtet werden und im chRCC war die Expression heterogen. Für eine eindeutige Aussage wäre eine größere Gewebeanzahl nötig gewesen. Einzig in den beiden klarzelligen und papillären RCCs konnte eine tendenziell stärkere Expression von Snai2 und SIP1 im Tumor detektiert werden.

RO	E-Cad.		N-Cad.		Snai1		Snai2		SIP1		CA-IX	
	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T
2426/02	++	++	++	++	+	+	+++	++	+++	++	-	+
5428/03	++	+++	++	+	(+)	(+)	++	++	++	+++	(+)	+
8758/02	++	+++	++	+	(+)	(+)	++	++	++	++	+	-
17791/01	+++	+++	++	+	(+)	(+)	++	++	+++	+++	+	-
17541/01	+++	+++	++	+	(+)	(+)	++	++	+++	+++	+	+
20086/01	++	++++	+	+	(+)	+(+)	++	++	++	+++	(+)	+
8852/02	+++	++++	+++	++(+)	+	+	+++	+++	+++	+++	+	+
599/03	++	+++	+	+	+	+	++	+++	++	++	+	+

**chRCC**

16277/04	+++	+++	+++	+	+	(+)	++	+	+++	++	(+)	(+)
18547/04	+	++++	+	++(+)	(+)	+	(+)	++	+	++	(+)	-

**ccRCC G1**

21790/01	(+)	+++	+	+++	(+)	++(+)	+	++++	+	+++	-	++++
16453/02	++	++	++	+++	++	++	++++	++++	+++	+++	-	++++
15949/03	+	+++	+	+++	(+)	(+)	+	++	+	++	+	++++
21362/01	++++	+++	+++	++++	+	++	+++	+++	+++	++++	+	++++
7250/01	++	+++	++(+)	++++	(+)	++	+	+++	++(+)	+++(+)	+	++++
2207/03	++	++	++	+++	+	+	++	+++	+++	+++	-	++++

**ccRCC G3-4**

18697/03	++	+	+++	+++	++	+	+++	+++	+++	+++	+	++
17260/01	+	+	++	++	(+)	+	++	+++	++	++	(+)	++
2644/02	++	+	++	+++	(+)	+	++	+++	++	+++	+	+++
11482/00	(+)	(+)	++	-	(+)	+	++	+++	+	++	(+)	++
8010/03	++	+++	++	++++	+	++	+++	++++	++	+++	(+)	++++
18750/01	+	++	++	+++	(+)	++	+	+++	+	++++	-	++++
11627/02	+++	+	+++	+++	+	+	++	++	++	+++	+	++++
10451/01	++	+	+++	+++	++	++	++	++	+++	+++	-	++
9631/03	+	+	++	+++	(+)	(+)	++(+)	+++	++	+++	(+)	+++
17889/01	+	++	++	++++	+	++	+	+++	++	++++	+	++++

**pRCC**

18802/02	++	(+)	++	+	(+)	(+)	+	(+)	++	+	+	+
17290/03	++	+++	++(+)	++++	+++	++	++	+++	+++	++++	(+)	+++
10822/00	+	+	+	++	++	+	+	(+)	(+)	++(+)	(+)+	+
9805/00	++	+	+	++	(+)	(+)	++	++	+	++	(+)	+++
2172/03	++	+	++	+++	(+)	+	++	++	++	+++	+	++
11879/03	++	+++	+	++++	(+)	(+)	+	++	++(+)	+++	(+)	++
13039/03	++	++	++	++++	(+)	(+)	++	++	++	+++	+	++
12347/02	++	+	+++	++	+	+	++	+++	++	+++	+	++++
22693/00	++	++	++	+++	+	++	+	++	++	+++	+	++
17696/03	+	(+)	+	+	+	(+)	+	(+)	+	+	+	+

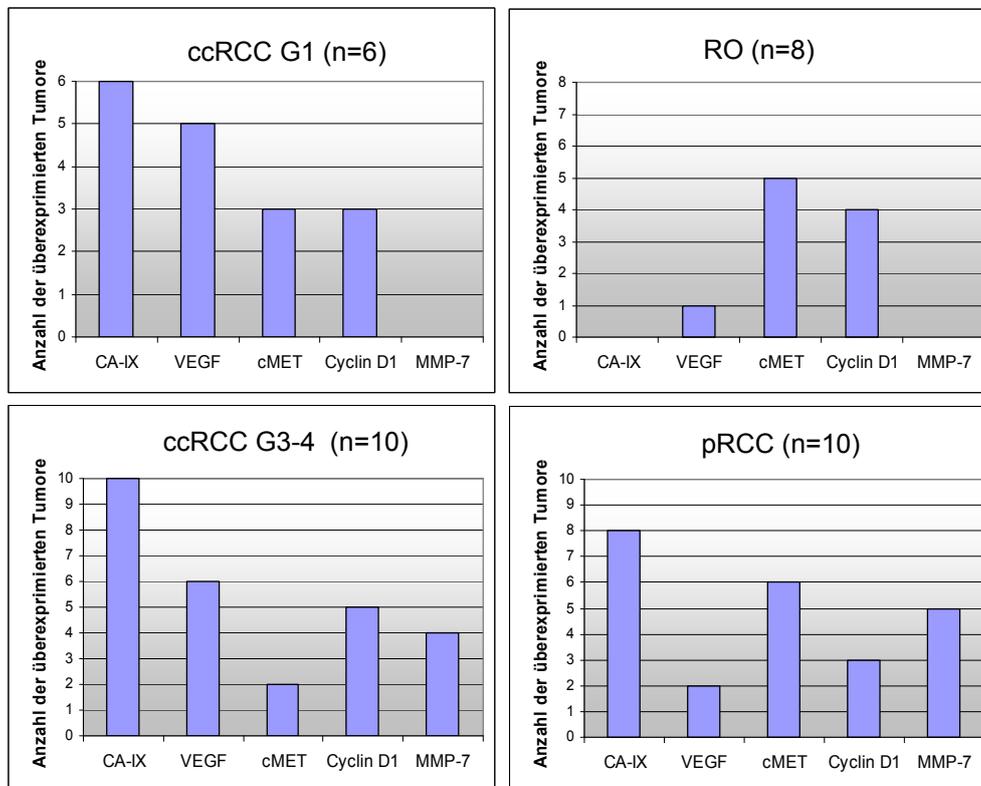
Überexpression  
Abregulation

CP-Wert	Bewertung
20 – 23	++++
23 – 26	+++
26 – 29	++
29 – 32	+
32 – 35	(+)
> 35	-

**Abb.34: mRNA-Expressionsanalyse von vier verschiedenen RCC-Subtypen.** RNA wurde aus kryopräserviertem Gewebe für die cDNA-Synthese extrahiert. Die Expression der untersuchten Gene in den Tumoren (T) wurde mit der in den jeweiligen Normalnieren (N) verglichen. Die Bewertung der CP-Werte von (-) bis (++++) wurde, wie in der Tabelle links gezeigt, vorgenommen. Die orange markierten Kästchen kennzeichnen eine Überexpression des Tumors im Vergleich zur gesunden Niere, die blau markierten Kästchen eine Abregulation.  
RO: renales Onkozytom; chRCC: chromophobes RCC; ccRCC: klarzelliges RCC; pRCC: papilläres RCC

Da die Hypoxie bei der EMT eine wichtige Rolle spielt, wurde die vorangegangene Analyse auf folgende vier Hypoxie-induzierbare Gene erweitert (Abb.35). VEGF

(“vascular endothelial growth factor”) trägt zur Regulation der Angiogenese bei, cMET („mesenchymal epithelial transition factor“; Met Proto-Onkogen) ist der Rezeptor für HGF, Cyclin D1 ist für die Regulation des Übergangs von der G1- in die S-Phase ver-

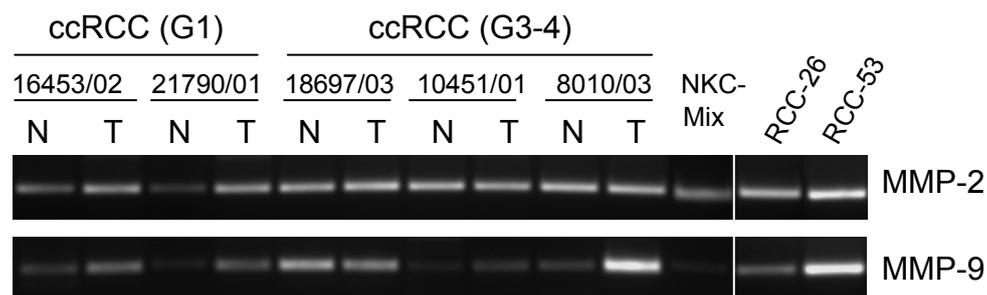


**Abb.35: mRNA-Expressions-Analyse von Hypoxie-induzierbaren Genen in verschiedenen Tumorsubtypen der Niere.** Tumor- und Nierengewebe wurden, wie in Abb.34 erwähnt, hergestellt und über ein Haushaltsgen normalisiert. Dargestellt wurde für jeden Tumorsubtyp die Anzahl der Tumoren, die das untersuchte Gen überexprimierten, im Vergleich zum korrespondierenden gesunden Nierengewebe. Ein Tumor wurde als überexprimierend eingestuft, wenn er mehr als die 15-fache Transkriptmenge für das untersuchte Gen im Vergleich zum gesunden Nierengewebe aufwies. Dies entspricht einem um annähernd vier Zyklen niedrigeren CP-Wert. n: Anzahl der Proben

antwortlich und MMP-7 (Matrix-Metalloproteinase 7) ist an der Umstrukturierung von Geweben beteiligt. In Abb.35 ist für jeden Tumorsubtyp (außer chRCCs) die Anzahl der überexprimierten Gene im Vergleich zur Normalniere dargestellt. Ein Tumor wurde als überexprimierend für die analysierten Gene eingestuft, wenn er mehr als die 15-fache Transkriptmenge im Vergleich zur Normalniere aufwies. CA-IX, als stärkster Hypoxie-Marker<sup>[197]</sup>, wurde, wie schon gezeigt, bei allen ccRCCs, bei acht von zehn pRCCs und bei keinem der Onkozytome als überexprimiert eingestuft. VEGF war überwiegend in den ccRCC-Subtypen überexprimiert (5/6 mit dem Tumorgrad G1 und 6/10 mit dem Tumorgrad G3-4) und kaum in den Onkozytomen (1/8) und den pRCCs (2/10). In ca. 50 % der Onkozytome, papillären und klarzelligen RCCs mit dem Tumorgrad G1 war cMET überexprimiert, jedoch nur in 20 % der ccRCCs mit dem Tumorgrad G3-4. In allen Tumorsubtypen war Cyclin D1 in 50 % oder weniger der Fälle überexprimiert und MMP-7 nur in den papillären (5/10) und

klarzelligen RCCs mit dem Tumorgrad G3-4 (4/10). MMP-7 wurde somit nur in den Tumoren mit der schlechtesten Prognose überexprimiert.

Die Matrix-Metalloproteinasen nehmen im Hinblick auf die Metastasierung eines Tumors eine wichtige Rolle ein. Bei den ccRCCs, auf die in der vorliegenden Arbeit ein Hauptaugenmerk gelegt werden soll, wurde deshalb für einige Vertreter exemplarisch die mRNA-Expression von MMP-2 und auch von MMP-9 untersucht (Abb.36). Diese wurden zusätzlich mit zwei Zelllinien der beiden Differenzierungsstufen verglichen (RCC-26 (G1) und RCC-53 (G3-4)).



**Abb.36: Vergleich der mRNA-Expression von MMP-2 und MMP-9 zwischen klarzelligen Tumoren mit dem Tumorgrad G1 und G3-4 und zwei Zelllinien der entsprechenden Tumorgrade.** cDNA von Tumor- und Nierengewebe wurden wie in den beiden vorangegangenen Analysen verwendet. Der NKC-Mix bestand aus cDNA von drei gesunden Nierengeweben.

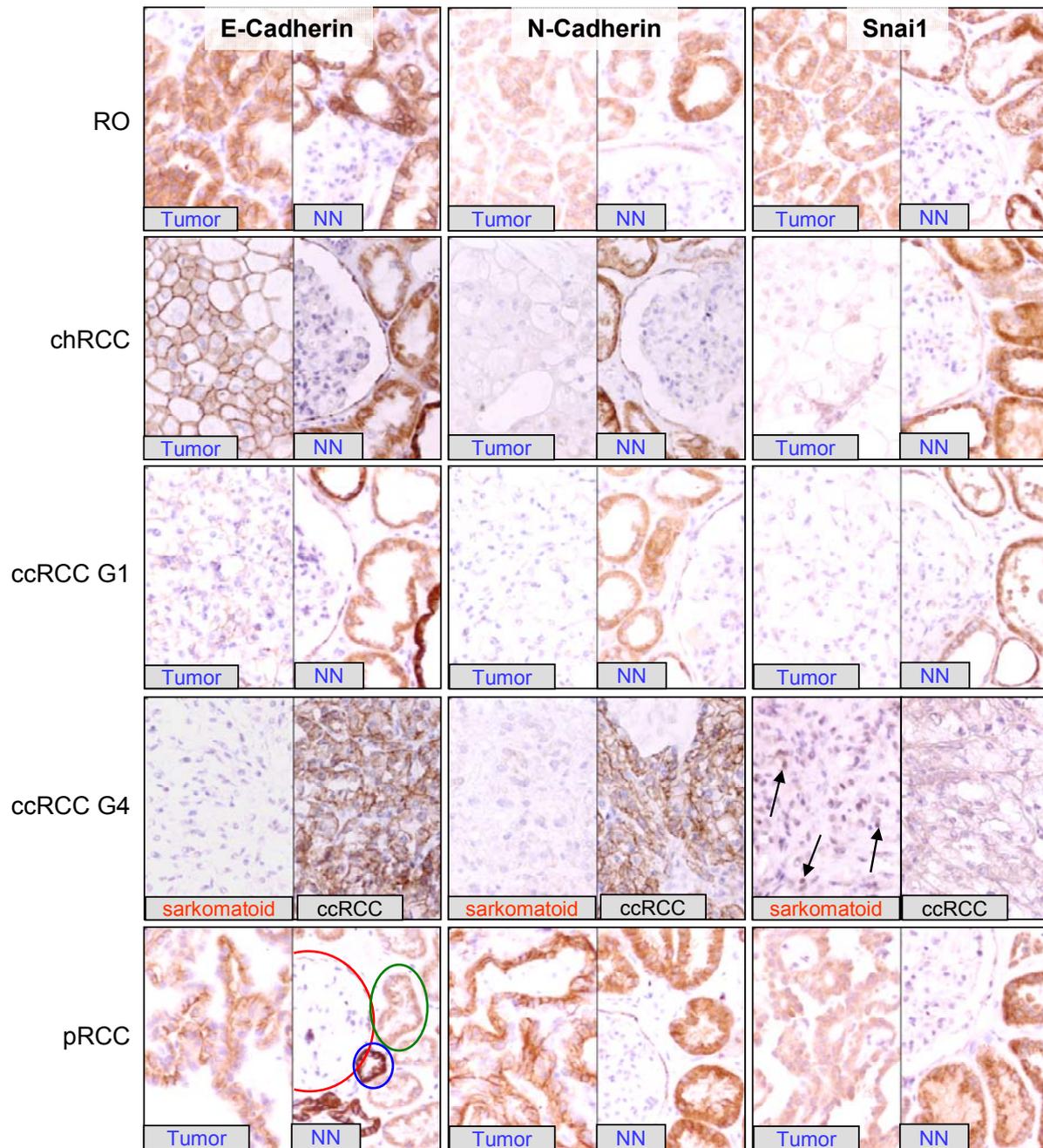
Hinsichtlich der MMP-2-Expression ergaben sich keine größeren Unterschiede, die MMP-9-Expression variierte jedoch teilweise stark. So variierte die Transkriptmenge sowohl innerhalb der Normalniere-Tumor-Pärchen als auch zwischen beiden Zelllinien. Dabei zeigte RCC-53 im Vergleich zu RCC-26 und lediglich ein ccRCC (G3-4) im Vergleich zu den anderen Tumoren eine stärkere MMP-9 Expression.

Gelingt es einer Tumorzelle, sich mit Hilfe von Matrix-Metalloproteinasen und anderen Faktoren aus dem Tumorverband herauszulösen, spielt eine gerichtete Migration bei der Metastasenbildung eine wichtige Rolle. Häufig kommen hier Chemokinrezeptoren und deren Liganden zum Einsatz. Wie schon in Kapitel 4.1.2 erwähnt, besteht ein Zusammenhang zwischen der CXCR4-Expression von metastasierenden Zellen und der chemotaktischen Wanderung in CXCL12-sezernierende Zielgewebe. Deshalb wurde die Expression von CXCR4 und seinem Liganden auf Transkriptebene untersucht. Dazu wurden die gleichen Tumoren wie in Abb.36 verwendet und um je einen Tumor pro Differenzierungsstufe erweitert (zusätzliche Abb.4). Sechs der sieben Tumoren zeigten für CXCR4 einen 9 bis 12-fache Überexpression im Vergleich zur Normalniere, nur bei einem Tumor mit dem Tumorgrad G3-4 war CXCR4 herunterreguliert. CXCL12 war bei allen Tumoren bis auf zwei herunterreguliert.

#### 4.2.2 Immunhistochemische Untersuchungen von EMT-Markern in vier verschiedenen RCC-Subtypen

Eine Transkript-Analyse lässt sich im Allgemeinen nicht immer mit einer Proteinexpressionsanalyse gleichstellen. Da auch die gezielte Lokalisation von Proteinen, wie E-, N-Cadherin und Snai1, wichtig für deren Funktion sein kann, wurden beispielhaft jeweils ein Tumor- und das entsprechende Normalnierengewebe aus unterschiedlichen Tumorsubtypen mit spezifischen Antikörpern immunhistologisch gefärbt (Abb.37a). Innerhalb des klarzelligem Tumors mit dem Tumorgrad G3-4 wurde ein sarkomatoider Bereich gefunden, der mit dem klarzelligem Anteil desselben Tumors verglichen wurde. Ein sarkomatoides Karzinom hat sowohl mesenchymale (Sarkom) als auch epitheliale (Karzinom) Elemente. Morphologisch definiert es sich durch pleomorphe Spindel- und Riesenzellen, die einem Sarkom ähneln, vermischt mit einem unterschiedlichen Anteil an klarzelligem oder granulären epithelialen Zellen. Für diesen Tumorsubtyp ist in der Literatur ein erhöhtes proliferatives Potential beschrieben sowie eine lokale Aggressivität verbunden mit einem erhöhten Metastasierungspotential. Daraus resultierend wird dem sarkomatoiden RCC eine schlechte Prognose zugeschrieben<sup>[198]</sup>.

Bei den Färbungen der Normalnierengewebe mit dem E-Cadherin-Antikörper wurde eine schwach E-Cadherin-Expression in den proximalen Tubuli gefunden, wobei die distalen Tubuli eine noch stärkere Expression zeigten. Die Nierenkörperchen exprimierten kein E-Cadherin. Die Proteinexpression in den Tumoren korrelierte überwiegend mit den Ergebnissen aus der parallel durchgeführten mRNA-Expressionsanalyse (Abb.37b). Das Onkozytom sowie das chRCC, das ccRCC mit dem Tumorgrad G3-4 und das pRCC zeigten eine starke Expression von E-Cadherin, beim klarzelligem G1-Tumor war sie jedoch schwach und beim sarkomatoiden Anteil des klarzelligem G3-4-Tumors fehlte sie ganz. Dieser Tumor war der einzige, der vereinzelt eine positive Snai1-Reaktion zeigte. Dennoch gab es sowohl bei den distalen und proximalen Tubuli der Normalniere als auch beim Onkozytom eine zytoplasmatische Snai1-Reaktion. In diesem Kompartiment jedoch hat Snai1 keine Funktion und wird über das Proteasom abgebaut. Für N-Cadherin war eine Expression in den distalen und proximalen Tubuli der Normalniere zu finden, nicht jedoch in den Nierenkörperchen. Übereinstimmend mit der mRNA-Analyse fehlte dem Onkozytom sowie dem chromophoben und klarzelligem G1-Tumor eine N-Cadherin-Expression, obwohl beim klarzelligem G1-Tumor, entsprechend der mRNA-Analyse, eine geringe Expression erwartet wurde. Des Weiteren konnte beim klarzelligem G3-4-Tumor und beim pRCC eine starke N-Cadherin-Expression beobachtet werden. Zusammenfassend konnte man feststellen, dass der sarkomatoider Subtyp am ehesten einem Tumor ähnelte, der zumindest ein Stadium der EMT durchlaufen hat.



- Nierenkörperchen
- proximaler Tubuli
- distaler Tubuli

**Abb.37a: Immunhistologische Färbung von fünf verschiedenen Tumortypen bzw. Tumorgaden der Niere.** Formalin-fixierte, in Paraffin-eingebettete Gewebeschnitte der Tumoren und der entsprechenden Nieren wurden mit einem E-, N-Cadherin- oder Snai1-Ak und einem Peroxidase markierten Anti-Maus- (E-, N-Cadherin) oder Anti-Ratte-Ak (Snai1) gefärbt. Der klarzellige G4-Tumor wurde mit einem sarkomatoiden Tumorbereich des gleichen Tumors verglichen. Die Pfeile markieren beispielhaft eine Kernfärbung für Snai1. Als Positivkontrolle für die Snai1-Färbung wurde Plazenta-Gewebe verwendet (ohne Abb.).

		E-Cad.	N-Cad.	Snai1
RO	20086/01	++++	+	+(+)
chRCC	18547/04	++++	+(+)	+
ccRCC G1	16453/02	++	++	++
ccRCC G3-4	8010/03	+++	++++	++
pRCC	11879/03	+++	++++	(+)

CP-Wert	Bewertung
20 – 23	++++
23 – 26	+++
26 – 29	++
29 – 32	+
32 – 35	(+)
> 35	-

**Abb.37b: Wiederholung der Ergebnisse aus Abb.34 als Vergleichsmöglichkeit zur Immunhistologie.**

### 4.2.3 mRNA- und immunhistochemische-Expressionsanalyse von EMT-assoziierten Molekülen in sarkomatoiden und klarzelligen RCCs

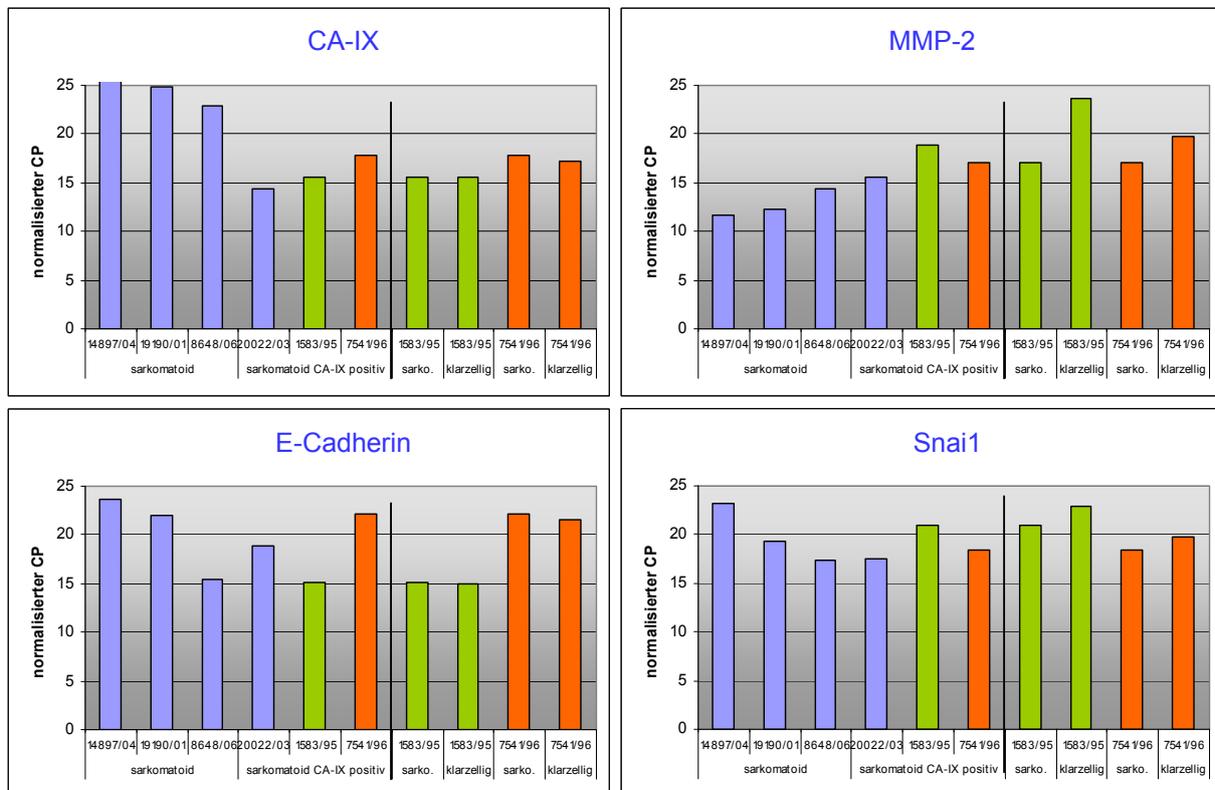
Die zuvor gewonnenen Ergebnisse gaben Anlass, weitere sarkomatoide Bereiche aus ccRCCs zu identifizieren und mittels Mikrodissektion für eine mRNA-Analyse zu isolieren. In der Tat konnten von Dr. Weirich der Pathologie (TUM) insgesamt neun Tumoren mit dem Tumorgrad G3-4 charakterisiert werden, die parallel sowohl sarkomatoide als auch klarzellige Bereiche aufwiesen. Am selben Institut wurde an Formalin-fixierten, in Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten dieser Tumoren und Normalnieren mehrmals eine Mikrodissektion mit dem PixCell Ite (Arcturus) durchgeführt, jedoch war die RNA-Ausbeute zu gering, um eine mRNA-Analyse durchführen zu können. In einer weiteren Kooperation mit Dr. Buchner vom LTI (Labor für Tumorimmunologie der LMU, München) wurde ein zweiter Versuch an einem MicroBeam (Palm) gestartet und die extrahierte RNA mit einem 2100 Bioanalyzer (Agilent) auf Integrität (Qualität) und Quantität überprüft (zusätzliche Abb.5). Sowohl die Mikrodissektion mit dem MicroBeam als auch eine Makrodissektion durch Abkratzen eines kleinen Tumorbereichs mit dem Skalpell vom Objektträger ergaben keine zufriedenstellende RNA-Mengen-Ausbeute und RNA-Qualität. Möglicherweise war die RNA-Qualität durch die Archivierung und den Extraktions-Prozess zu sehr degradiert.

Um dennoch eine mRNA-Analyse von sarkomatoiden RCC-Bereichen durchführen zu können, wurden Schnitte von sechs Formalin-fixierten, in Paraffin-eingebetteten Gewebelöcken von RCC-Patienten verwendet, die einen rein sarkomatoiden Tumoranteil aufwiesen (Befund durch Pathologe Dr. Weirich, TUM). Es konnte dabei jedoch nicht der Tumorsubtyp charakterisiert werden, aus dem sich der sarkomatoide Tumor entwickelt haben könnte, bis auf zwei Tumoren, von denen auch ein klarzelliger Anteil auf einem separaten Gewebelöck vorhanden war. Diese konnten mit den sarkomatoiden Bereichen verglichen werden. Die eingesetzte cDNA-Menge für die mRNA-Analyse von typischen EMT-assoziierten Genen sowie von weiteren neuen Genen wurde über ein Haushaltsgen normalisiert. Unter den neu untersuchten Genen waren zwei weitere E-Cadherin-Repressoren ( $\delta$ EF1 und E12/E14) und drei Hypoxie-assoziierte Gene (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$ 4). HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  sind Transkriptionsfaktoren, die bei Sauerstoffmangel die Transkription von Hypoxie-induzierbaren Genen induzieren und nur bei ausreichendem Sauerstoffangebot von VHL ubiquitiniert und dem Proteasom zugeführt werden. HIF-3 $\alpha$ 4 dagegen ist ein dominant-negativer Regulator von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  und wird ebenfalls durch Sauerstoff reguliert. Zudem ist er in den meisten primären RCCs dramatisch herunterreguliert<sup>[37]</sup>. Obwohl der genaue Ursprung von vier sarkomatoiden Tumoren nicht bekannt war, konnte anhand der CA-IX-Expression dennoch eine Einteilung in eine CA-IX-positive und eine CA-IX-negative Gruppe vor-

sarkomatoide Tumore	CA-IX VEGF	E-Cad., Snai1, Snai2, SIP1, deltaEF1, E12/E14, VHL, WT1, MMP-9, MMP-7, HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$	MMP-2, HIF-3 $\alpha$ 4
14897/04			
19190/01			
8648/06			
20022/03			
1583/95 + ccRCC			
7541/96 + ccRCC			

**Abb.38: Überblick über die mRNA-Expressionsunterschiede von sechs sarkomatoiden und zwei entsprechenden klarzelligen Tumoren der Niere.** RNA wurde für die cDNA-Synthese aus Formalin-fixierten, in Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten gewonnen. Quantitative cDNA-Mengenvariationen wurden über ein Haushaltsgen abgeglichen. Die Tumoren wurden in eine CA-IX-negative (gelb hinterlegt) und CA-IX-positive (hellblau hinterlegt) Gruppe eingeteilt. Bei den beiden unteren Tumoren der CA-IX-positiven Gruppe wurden ebenfalls die entsprechenden klarzelligen Tumorbereiche untersucht. Die blauen Dreiecke kennzeichnen das Expressionsverhältnis zwischen beiden Gruppen. Zwei gegenläufige Dreiecke stellen ähnliche Expressionsniveaus dar oder stehen für eine heterogene Expression innerhalb der genannten Gruppen.

genommen werden. In der CA-IX-positiven Gruppe waren die beiden Tumoren mit dem klarzelligen Anteil und ein weiterer Tumor, der vermutlich einen klarzelligen oder auch papillären Ursprung hat. Die Tumoren der anderen Gruppe waren entweder gleichen Ursprungs und CA-IX-negativ oder stammen von einem anderen Tumor-Subtyp (z.B. chRCC) ab. In Abb.38 ist das Expressionsverhältnis der untersuchten



**Abb.39: mRNA-Expressionsanalyse von sechs sarkomatoiden und zwei entsprechenden klarzelligen Tumoren der Niere.** cDNA wurde wie in Abb.38 beschrieben hergestellt. Die ersten drei Tumoren gehörten zur CA-IX-negativen Gruppe, alle übrigen zur CA-IX-positiven Gruppe. Die rechten vier Balken eines jeden Diagramms beinhalten je zwei Pärchen (grün und orange) aus sarkomatoiden und klarzelligen Tumoren. Dargestellt wurden die durch ein Haushaltsgen normalisierten CP-Werte.

Gene innerhalb der beiden Gruppen dargestellt. Die Tumoren, die CA-IX exprimierten, hatten auch ein höheres Expressionsniveau für VEGF, dagegen wurden MMP-2 und HIF-3 $\alpha$ 4 in der anderen Gruppe stärker exprimiert. Eine Herunterregulation der HIF-3 $\alpha$ 4-Expression konnte somit zumindest in der CA-IX-positiven Gruppe bestätigt werden. Die übrigen untersuchten Gene (E-Cad., Snai1, Snai2, SIP1,  $\delta$ EF1, E12/E14, VHL, WT1, MMP-7, MMP-9, HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$ ) zeigten in allen Tumoren entweder ein sehr einheitliches oder heterogenes, teils gegensätzliches Expressionsmuster (Abb.39 und zusätzliche Abb.6). Die Expressionsunterschiede in der „real time“-PCR waren bis auf MMP-2 innerhalb eines sarkomatoiden und klarzelligigen Tumorpärchens nicht größer als drei CP-Werte. Betrachtete man die E-Cadherin-Repressoren und WT1, konnte man bis auf eine gegenläufige Snai1- und E-Cadherin-Expression in der CA-IX-positiven Gruppe keine Regulation von E-Cadherin erkennen. VHL, HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  befanden sich auf einem relativ einheitlichen Expressionsniveau. Zudem wurden die beiden HIF- $\alpha$ -Isoformen verhältnismäßig stark exprimiert und schienen nicht durch VHL oder HIF-3 $\alpha$ 4 reguliert zu werden. Die Expression von MMP-7 und MMP-9 war heterogen und konnte keinem Muster zugeordnet werden.

Da die vorangegangene mRNA-Analyse die erwähnten Limitationen beinhaltete, wie fehlende Tumorsubtyp-Charakterisierung, fehlende Vergleichsmöglichkeit von zumindest vier sarkomatoiden Tumoren mit dem Karzinom-Anteil und fehlende Bestimmung einer Proteinlokalisierung, wurden neun weitere Formalin-fixierte, in Paraffin-eingebettete Tumoren mit je einem klarzelligem und einem sarkomatoiden Anteil immunhistochemisch untersucht. Die Bereitstellung und Charakterisierung der Tumoren erfolgte wiederum durch Dr. Weirich von der Pathologie der TUM. Folgende Antikörper standen zur Verfügung: E-Cadherin und Snai1 (wie in Abb.37a), VHL, CA-IX, HIF-2 $\alpha$ , WT1,  $\beta$ -Catenin und NY-ESO-1. Die beiden letzten Proteine wurden neu in das Analyse-Repertoire aufgenommen.  $\beta$ -Catenin hat zwei Funktionen. Zum einen ist es bei der Verankerung des Cadherin-Komplexes an der Zellmembran beteiligt und zum anderen kann es im Zellkern als Transkriptionsfaktor fungieren, wenn es ungebunden vorliegt. NY-ESO-1 ist ein klassisches CTA („cancer-testis antigen“). Eine Funktion ist nicht bekannt, jedoch hat es aus immunologischer Sicht eine wichtige Bedeutung als Zielantigen für die Antikörper- und Zell-vermittelte Immunität<sup>[199]</sup>. Als Positivkontrolle für die einzelnen Färbungen wurden Gewebeschnitte verwendet, die das untersuchte Protein exprimieren (z.B. Plazenta- oder Hodengewebe). Die Auswertung der Intensität und Lokalisation der Färbungen wurden in Abb.40 vereinfacht zusammengefasst. Aufgeführt wurde die Anzahl der auswertbaren Tumoren, die eine positive Proteinexpression im angegebenen Kompartiment zeigten. Eine E-Cadherin-Expression an der Membran (M) konnte in 5/8 klarzelligem Tumoren gefunden werden, bei den sarkomatoiden Tumoren hingegen in keinem der Fälle. Bei beiden Tumorsubtypen konnte jedoch in der Hälfte

	E-Cadherin		Snai1	VHL	CA-IX	HIF-2 $\alpha$	WT1	$\beta$ -Catenin		NY-ESO-1
	M	N	N	Z	Z+M	N	N	M	N	Z
klarzellig	5/8	4/8	0/8	9/9	8/9	0/9	0/9	8/9	0/9	0/8
sarkomatoid	0/8	4/8	0/4	3/9	3/9	0/7	0/8	8/9	0/7	0/7

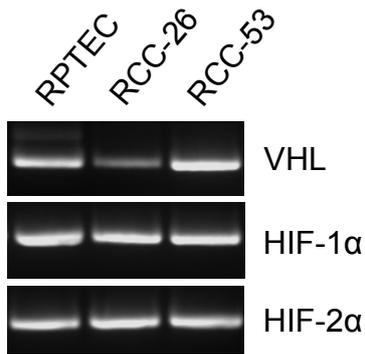
**Abb.40: Immunhistologische Färbungen von RCCs mit sarkomatoiden und klarzelligen Anteilen.** Neun Formalin-fixierten, in Paraffin-eingebettete Tumoren mit je einem klarzelligen und einem sarkomatoiden Anteil wurden mit den in der Tabelle genannten spezifischen Antikörpern und einem Peroxidase markierten Anti-Maus-Ak gefärbt. Unter den neun Tumoren hatte einer eingestreute epitheliale (klarzellige) Zellen im sarkomatoiden Anteil. Aufgeführt wurde die Anzahl der auswertbaren Tumoren, die eine positive Proteinexpression zeigten. Zudem wurde die Lokalisation berücksichtigt, in der das jeweilige Protein seine Effektor-Funktion ausübt. M: Membran; Z: Zytoplasma; N: Nukleus

der Tumoren (4/8) eine E-Cadherin-Expression im Nukleus (N) beobachtet werden. Snai1 wurde in keinem der Tumoren exprimiert. Das VHL-Genprodukt ließ sich in allen klarzelligen Anteilen im Zytoplasma wiederfinden, dafür aber nur in einem Drittel (3/9) der sarkomatoiden Anteile. Eine CA-IX-Expression wurde in 8/9 klarzelligen Anteilen gefunden, dagegen nur in 3/9 sarkomatoiden Anteilen. CA-IX war sowohl an der Membran als auch im Zytoplasma lokalisiert. Eine Expression von HIF-2 $\alpha$  und WT1 wurde bei keinem der Tumoren im Nukleus gefunden. Auch  $\beta$ -Catenin war nicht im Nukleus lokalisiert, dafür an der Membran in beiden Anteilen (klarzellig und sarkomatoid) bei 8/9 Tumoren. Alle Tumoren waren NY-ESO-1 negativ.

### 4.3 Modulation von Hypoxie-regulierten Genen *in vitro*

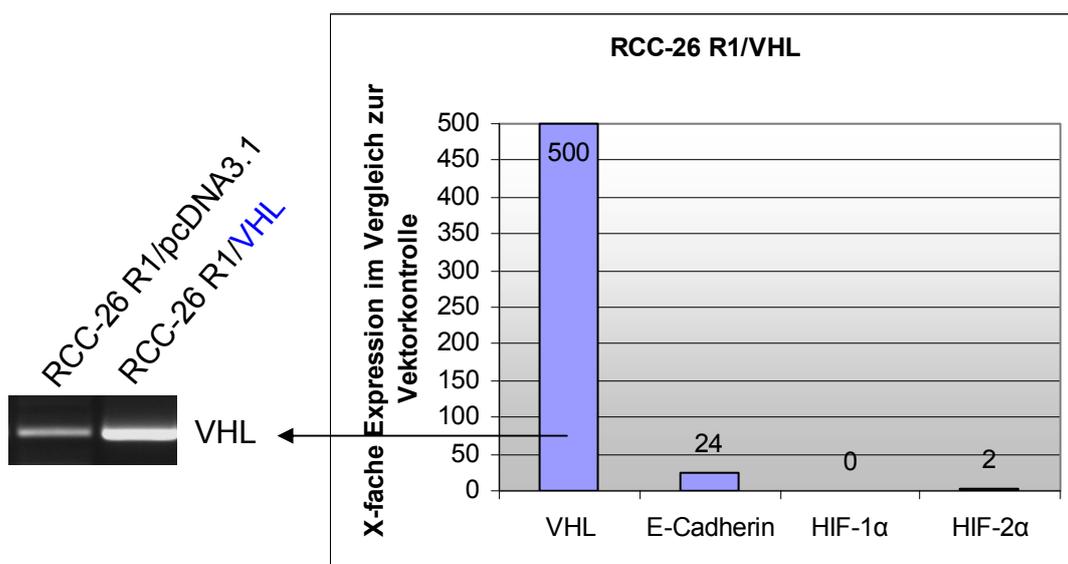
#### 4.3.1 Modulation der VHL-Expression durch Gentransfer

Das von Hippel-Lindau-Protein nimmt innerhalb des sauerstoffregulierten Signalweges eine zentrale Rolle ein. Ein Verlust von VHL, wie er häufig im RCC beobachtet wird, sei es durch den angeborenen Verlust eines VHL Allels, durch erworbene inaktivierende Mutationen oder durch Hypermethylierung, hat eine HIF- $\alpha$  Anhäufung zur Folge und somit eine Hochregulierung des Hypoxie-induzierten Transkriptoms. Dabei werden globale Expressionsprofile der Angiogenese, des Energie-Metabolismus und der Proliferation verändert, darunter VEGF, MMP-2, MMP-9, CXCR4, TGF- $\beta$ 1, Snai1, SIP1 und E-Cadherin. Eine Korrelation zwischen mutiertem/inaktiviertem VHL und fehlender E-Cadherin-Expression ist in unabhängigen Versuchen eindeutig belegt<sup>[8,9,84]</sup>. Umgekehrt führt eine VHL-Reexpression in VHL-defizienten ccRCCs auch zur Reexpression von E-Cadherin<sup>[8]</sup>. Wie in vorangegangenen Versuchen gezeigt wurde, war bei RCC-26 die VHL-Expression durch Hypermethylierung herunterreguliert. Im Vergleich zu RPTEC und RCC-53 konnte dies bestätigt werden (Abb.41). Erstaunlicherweise exprimierten alle drei untersuchten Zellen ähnlich viel HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  auf Transkriptebene.



**Abb.41: mRNA-Expressionsanalyse von Hypoxie-regulierten Genen.** Die Transkriptexpressionsniveaus von VHL, HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  wurden für RPTEC, RCC-26 und RCC-53 verglichen.

Um eine mögliche funktionelle Inaktivierung von VHL in RCC-26 und RCC-53 auszuschließen, wurde bei beiden ein molekulargenetisches Gutachten des VHL-Status von Dr. Ehlers des Zytogenetischen und Molekulargenetischen Labors von Dr. Prager und Dr. Junge in Dresden durchgeführt. Dieses umfasste eine MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) -Analyse, über die eine genomische Quantifizierung als auch Deletionen und Duplikationen nachweisbar sind sowie die Sequenzierung der Exons eins bis drei, inklusive der flankierenden Intronbereiche. Laut Befund lag in RCC-26 eine heterozygote Deletion des VHL-Gens vor. In RCC-53 konnte die heterozygote Punktmutation 551T>C im Exon drei nachgewiesen werden, die den Einbau der Aminosäure Prolin anstelle von Leucin in der Position 184 zur Folge hat (p.Leu184Pro). Da bei beiden Zelllinien die Deletion bzw. Punktmutation nur ein Allel betraf, sollte funktionelles VHL-Protein in den Zellen vorhanden sein. Da bei RCC-26, wie beschrieben, die VHL-Expression herunterreguliert war, sollte mittels VHL-Genstransfer versucht werden, die E-Cadherin-Expression zu induzieren. Dazu wurde die cDNA von VHL aus RPTEC am-

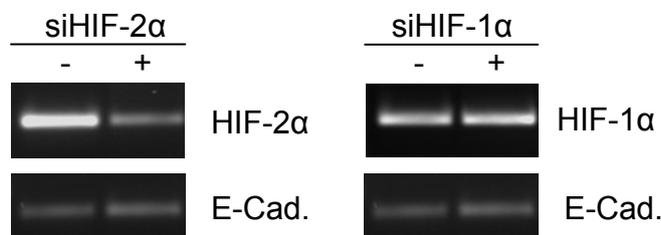


**Abb.42: Stabile Expression von VHL in RCC-26 R1.** RCC-26 wurde mit einem VHL-Vektor stabil transfiziert. Transkriptexpression von VHL, sowie von E-Cadherin, HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  wurden mit der stabilen Vektor-Transfektante von RCC-26 R1 verglichen. PCR-Produkte von VHL wurden über ein Agarosegel visualisiert (links).

amplifiziert und in einen Expressionsvektor (pcDNA3.1) kloniert. Die korrekte Sequenz wurde über die Sequenz-Analyse bestätigt. Für die stabile Transfektion des VHL-Expressionsvektors wurde RCC-26 R1 (ein Klon von RCC-26) verwendet und die VHL- sowie E-Cadherin-, HIF-1 $\alpha$ - und HIF-2 $\alpha$ -Expression auf Transkriptebene untersucht (Abb.42). Die VHL-Expression konnte auf mRNA-Ebene im Vergleich zur Vektorkontrolle deutlich gesteigert werden. Auch die E-Cadherin-Expression nahm dadurch um mehr als die 16-fache Transkriptmenge zu. Eine Reexpression konnte somit auf Transkriptebene erreicht werden, nicht jedoch eine Oberflächenexpression in der FACS-Analyse (ohne Abb.). Im Gegensatz dazu blieb die HIF-1 $\alpha$ - und HIF-2 $\alpha$ -Expression unverändert. Es ist jedoch zu beachten, dass VHL die HIF- $\alpha$ -Expression auf Proteinebene reguliert.

#### 4.3.2 Modulation der HIF- $\alpha$ -Expression durch RNA-Inhibition und RNA-Transfer

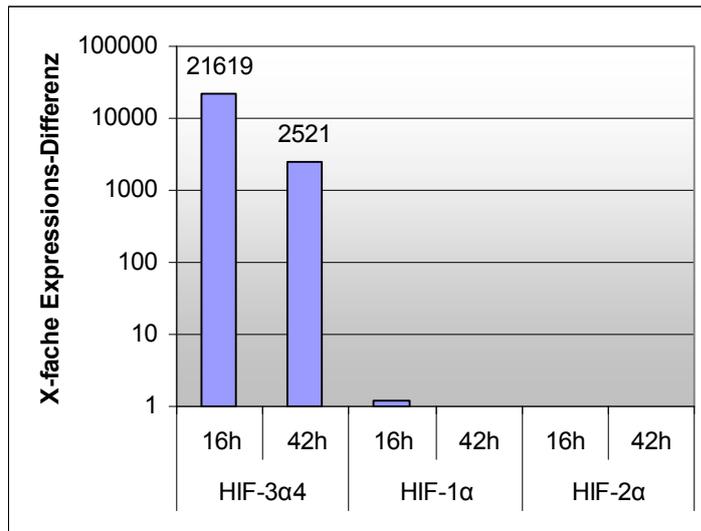
Durch die VHL-Reexpression konnte wie gezeigt die HIF-1 $\alpha$ - und HIF-2 $\alpha$ -Expression auf Transkriptebene nicht verringert werden. Um dennoch eine Herunterregulation zu erreichen, wurde der Klon RCC-26 R1 mit je einem Mix aus vier verschiedenen siRNAs (small interfering RNAs) gegen HIF-1 $\alpha$  oder HIF-2 $\alpha$  transfiziert und nach 24 h die Transkript-Menge der beiden Zielgene und von E-Cadherin untersucht (Abb.43).



**Abb.43: HIF-1 $\alpha$ - und HIF-2 $\alpha$ -Inhibition in RCC-26 R1.** RCC-26 R1 wurde mit einem Mix aus vier siRNAs gegen HIF-1 $\alpha$  oder HIF-2 $\alpha$  transfiziert und 24 h später die Transkript-Menge von HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  u. E-Cadherin untersucht.

Nach Transfektion der siRNA gegen HIF-2 $\alpha$  konnte eine deutliche Verringerung der HIF-2 $\alpha$ -Transkript-Menge in RCC-26 R1 beobachtet werden, dennoch kam es nicht zu einer E-Cadherin-Expressionssteigerung. Bei HIF-1 $\alpha$  zeigte die siRNA keinen Effekt, weder auf die HIF-1 $\alpha$ -Transkriptexpression noch auf die E-Cadherin-Expression. In einem dritten und letzten Ansatz wurde auf einem anderen Weg versucht, die HIF- $\alpha$ -Expression zu verringern. Hierfür wurde eine transiente Expression mit *ivt*RNA (*i*n *v*itro t*r*anscribed RNA) von HIF-3 $\alpha$ 4, einem dominant-negativem Regulator von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$ , in RCC-26 R1 durchgeführt (Abb.44). Mit Hilfe von zwei unabhängigen Versuchen wurde die HIF-3 $\alpha$ 4-, HIF-1 $\alpha$ - und HIF-2 $\alpha$ -Transkript-Menge nach 16 oder 42 h untersucht. Dabei wurden auch unterschiedliche *ivt*RNA-Mengen transfiziert. Für die Transkript-Analyse nach 16 h wurden 20  $\mu$ g *ivt*RNA transfiziert im Vergleich zu 40  $\mu$ g bei der 42-h-Analyse. RCC-

26 R1 besaß keine HIF-3 $\alpha$ -Transkriptexpression (CP-Wert  $\geq 40$ ). 16 h nach HIF-3 $\alpha$ -*ivt*RNA-Transfektion stieg die HIF-3 $\alpha$ -Transkript-Menge um mehr als das  $2 \times 10^4$ -fache an (CP-Differenz ca. 14,4), die nach 42 h um knapp eine Log-Stufe abnahm (CP-Differenz 11,3), wenn man pro Zyklus eine Verdopplung der Transkriptmenge in der qRT-PCR zugrunde legt. Bis auf geringe Variationen blieb jedoch sowohl die HIF-1 $\alpha$ - als auch HIF-2 $\alpha$ -Expression an beiden Zeitpunkten unverändert.



**Abb.44: HIF-3 $\alpha$ -*ivt*RNA-Transfektion in RCC-26 R1.** *ivt*RNA von HIF-3 $\alpha$  wurde in zwei unabhängigen Versuchen in RCC-26 R1 elektroporiert. Nach 16 h und 42 h wurde die Transkript-Menge von HIF-3 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  mit Wasser-transfizierten RCC-26 R1-Zellen verglichen. Bei den 16-h-Werten wurde 20  $\mu$ g *ivt*RNA transfiziert und bei den 42-h-Werten 40  $\mu$ g.

Im Rahmen der Hypoxie-regulierten Gene sollte auch CA-IX auf einen Einfluss von EMT-assoziierten Genen hin untersucht werden, da bei einigen sarkomatoiden Tumoren die CA-IX-Expression auf Proteinebene herunterreguliert war (Abb.40). Eine Regulation von CA-IX wurde ausschließlich durch HIF-1 $\alpha$  im ccRCC beschrieben<sup>[41]</sup>. Zudem wurde gezeigt, dass CA-IX die E-Cadherin-vermittelte Adhesion über eine Interaktion mit  $\beta$ -Catenin vermindert<sup>[87]</sup>. Für diese Fragestellung stand die stabil-transfizierte RCC-Zelllinie SKRC 59/CA-IX zur Verfügung, die eine (inaktivierende) Mutation im VHL-Gen trägt und HIF-1 $\alpha$  nicht exprimiert<sup>[41]</sup>. Die CA-IX-exprimierende SKRC 59-Transfektante zeigte eine ca.  $5 \times 10^5$ -fach höhere CA-IX-Expression als die Vektorkontrolle. Hinsichtlich der E-, N-Cadherin-, Snai1-, Snai2-, SIP1- und WT1- Expression ergaben sich keine Unterschiede (zusätzliche Abb.7).

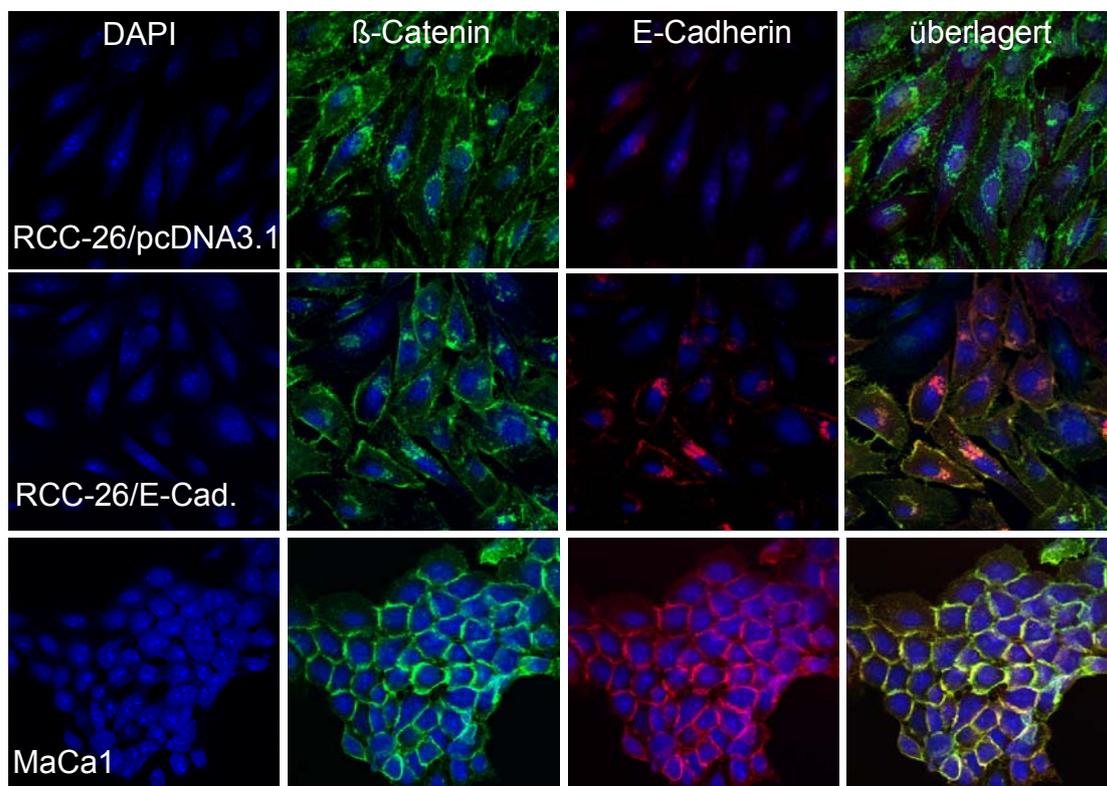
#### 4.4 Modulation der E-Cadherin-Expression *in vitro*

##### 4.4.1 Herstellung von stabilen E-Cadherin-Transfektanten

E-Cadherin, der Wächter des epithelialen Phänotyps, wurde auf RCC-Zelllinien schwach oder gar nicht exprimiert (siehe Kapitel 4.1). Eine Reexpression von E-Cadherin über epigenetische Modulation ist für eine detaillierte Untersuchung der

EMT bzw. MET kein geeignetes Mittel, da hierdurch das Transkriptom der Zelle teilweise stark beeinflusst wird. Deshalb wurde der direkte Weg über die stabile Transfektion eines E-Cadherin-Expressionsvektors in RCC-26 gewählt. Die Expression von E-Cadherin konnte auf Transkriptebene stark gesteigert werden (ohne Abb.). Zusammen mit  $\beta$ -Catenin wurden auch Untersuchungen zur Protein-Lokalisation angestellt (Abb.45). MaCa1 diente für beide Proteine als Positivkontrolle. Im Vergleich zur Vektorkontrolle konnte bei RCC-26/E-Cadherin eine leichte membranständige E-Cadherin-Expression auf einigen Zellen gezeigt werden. Zusätzlich wurde E-Cadherin auch intrazellulär detektiert, wobei es sich bei der Lokalisation vermutlich um das endoplasmatische Retikulum handelte.  $\beta$ -Catenin war in beiden Fällen unverändert an der Membran sowie intrazellulär lokalisiert. Durch eine Überlagerung der beiden Färbungen, konnte eine Kolokalisation von  $\beta$ -Catenin und E-Cadherin festgestellt werden.

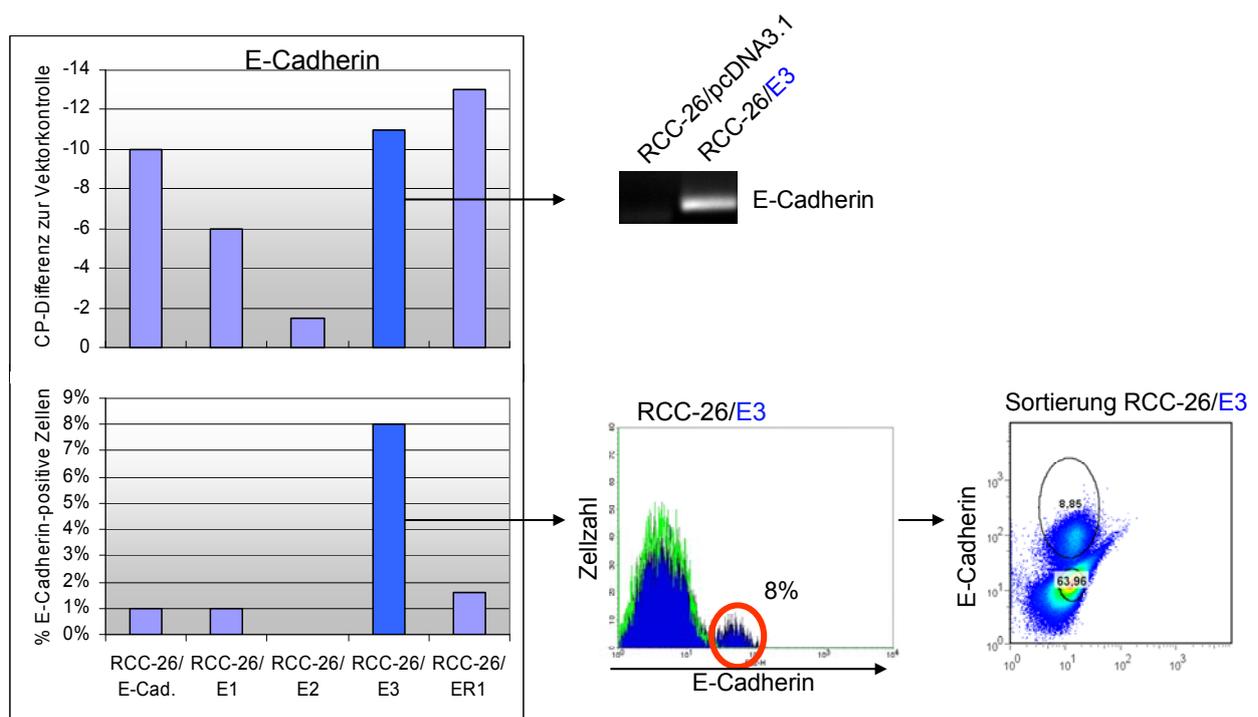
Da nicht alle Zellen von RCC-26/E-Cadherin eine E-Cadherin-Proteinexpression aufweisen konnten, sollte ein E-Cadherin-positiver Klon selektiert werden. Die klonale Herkunft spielte auch hinsichtlich einer immunologischen Erkennung durch Lymphozyten in weiteren Versuchen eine Rolle. Durch zweifach wiederholte, limitierte Verdünnung wurden drei Klone gewonnen, deren E-Cadherin-Expression



**Abb.45: Immunfluoreszenzmikroskopie einer stabilen E-Cadherin-Transfektante von RCC-26.** RCC-26 wurde entweder mit einem E-Cadherin-Vektor oder dem Leervektor stabil transfiziert und mit spezifischen Antikörpern gegen  $\beta$ -Catenin oder E-Cadherin und einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Subklasse-spezifischen Anti-Maus-Antikörper gefärbt. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Bei einer Kolokalisation von  $\beta$ -Catenin und E-Cadherin in der überlagerten Darstellung erscheint die Färbung gelb. MaCa1 diente als Positivkontrolle.

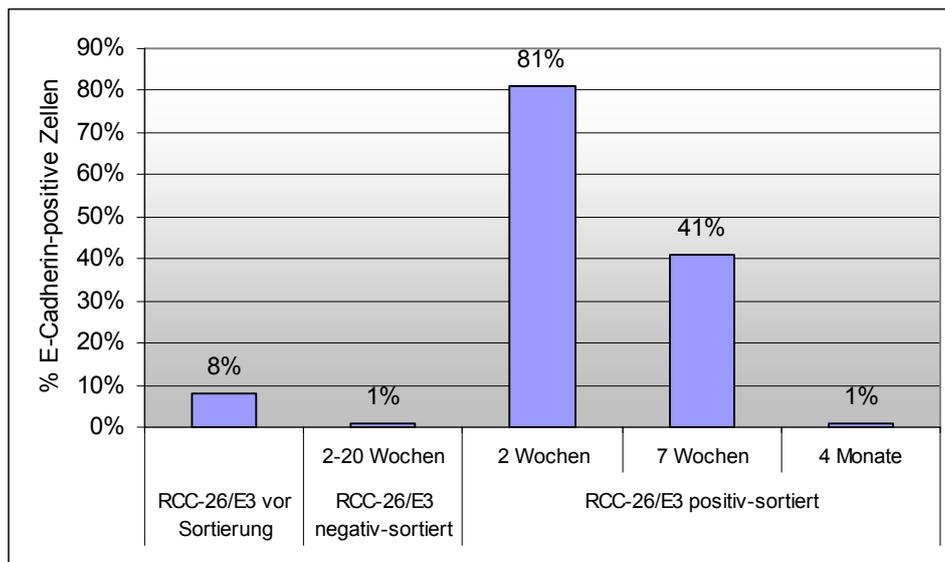
auf Transkript- und Proteinebene analysiert wurde (Abb.46). Zusätzlich wurde eine weitere E-Cadherin-Transfektante von einem bereits etablierten Klon von RCC-26 (RCC-26/ER1) hergestellt, um von Anfang an für die Transfektion einen RCC-26-Klon einsetzen zu können. Aus Abb.46 geht hervor, dass unter den Transfektanten, egal, ob klonaler oder unklonierter Herkunft, keine Korrelation zwischen der E-Cadherin-Transkriptexpression und Oberflächenproteinexpression besteht. Konnte bei der RCC-26/E-Cadherin-Linie noch eine E-Cadherin-Transkriptexpression beobachtet werden, die im Vergleich zur Vektorkontrolle ca. 1000-fach erhöht war, besaß der Klon E1 nur eine ca. 60-fach stärkere Expression und der Klon E2 nur eine ca. 3-fach stärkere Expression als die Vektorkontrolle.

Die stärkste E-Cadherin-mRNA-Expression zeigte RCC-26/ER1. Bei der Oberflächenexpression von E-Cadherin hatte der Klon E3 als einziger mit 8 % positiven Zellen im Vergleich zu der jeweiligen Vektorkontrolle eine verhältnismäßig gute Expression. Der E-Cadherin Klon E3 von RCC-26 sollte weiter untersucht werden, da er im Vergleich zu den übrigen Klonen den höchsten Anteil an Oberflächen-E-Cadherin-



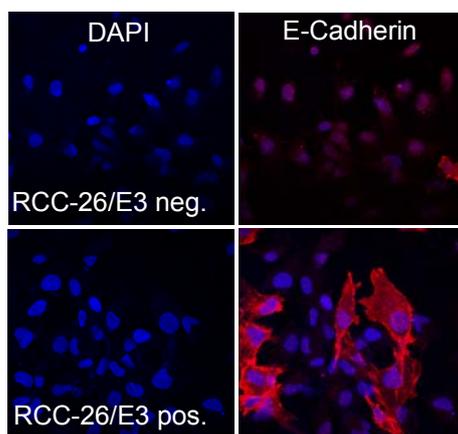
**Abb.46: E-Cadherin-mRNA-Expressions- und FACS-Analyse von stabilen E-Cadherin-Transfektanten und deren Klonen.** Aus der E-Cadherin-Transfektante RCC-26/E-Cadherin (siehe Abb.45) wurden drei Klone über limitierte Verdünnung gewonnen (RCC-26/E1, -E2 und -E3). Zusätzlich wurde eine stabile E-Cadherin-Transfektante aus einem Klon von RCC-26 (R1) hergestellt (RCC-26/ER1). Das obere Diagramm zeigt die CP-Differenz der E-Cadherin-Expression zur jeweiligen Vektorkontrolle. Je größer die Differenz (negativer CP-Wert), umso höher war der Transkriptanteil für E-Cadherin in den analysierten Transfektanten. Die PCR-Produkte von RCC-26/E3 wurden zusätzlich auf einem Agarosegel visualisiert. Das untere Diagramm zeigt die Oberflächen-E-Cadherin-Expression als prozentualen Anteil der positiven Zellen. Die Färbung wurde wie unter 3.2.1 beschrieben durchgeführt. Rechts daneben wurde zusätzlich für RCC-26/E3 das Histogramm der E-Cadherin-FACS-Analyse dargestellt und dem Pfeil folgend die Sortierungsstrategie der E-Cadherin-positiven Zellen mit dem MoFlo™.

positiven Zellen aufwies. Um den Anteil der E-Cadherin-positiven Zellen zu erhöhen, wurden mit Hilfe eines MoFlo™ „High-Performance Cell Sorters“ sowohl die E-Cadherin-positiven Zellen sortiert (8,8 %) als auch (als Kontrolle) die E-Cadherin-negativen Zellen (Abb.46). Nachdem zwei Wochen später genug Zellen für eine E-Cadherin-FACS-Analyse zur Verfügung standen, stellte sich heraus, dass 81 % der E-Cadherin-positiv-sortierten Zellen tatsächlich E-Cadherin an der Oberfläche exprimierten, nach sieben Wochen aber nur noch 41 % und nach vier Monaten lediglich nur mehr 1 % der Zellen (Abb.47).



**Abb.47: Oberflächen-E-Cadherin-Expression von RCC-26/E3 vor und nach der Sortierung.** RCC-26/E3 wurde mit einem spezifischen E-Cadherin-Antikörper und einem PE-markierten Anti-Maus-Antikörper gefärbt und vor, sowie nach der Sortierung an den angegebenen Zeitpunkten die E-Cadherin-positiven Zellen bestimmt. RCC-26/E3 negativ-sortierte Zellen dienen als Negativkontrolle.

Bei der Überprüfung der Protein-Lokalisation nach zehn Wochen konnte zum einen das Ergebnis der FACS-Analyse bestätigt werden, nämlich der E-Cadherin-Verlust von einigen Zellen, und zum anderen eine starke E-Cadherin-Expression an der Membran von E-Cadherin-positiven Zellen, als auch im Zytoplasma (Abb.48).



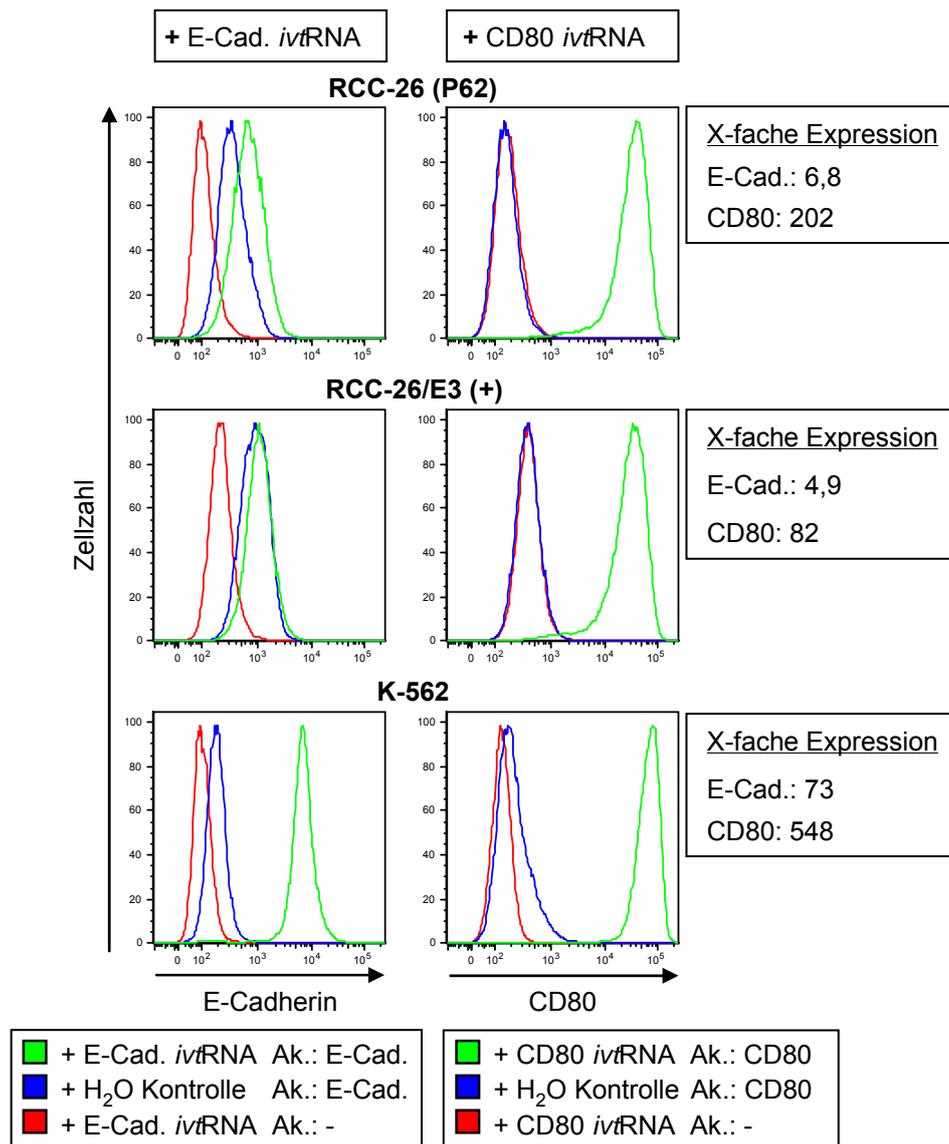
**Abb.48: Immunfluoreszenz-Mikroskopie der E-Cadherin-Expression von RCC-26/E3 zehn Wochen nach Sortierung der E-Cadherin-positiven Zellen.** RCC-26/E3 (siehe Abb.46/47) wurde zehn Wochen nach Sortierung der E-Cadherin-positiven Zellen wie in Abb.45 gefärbt und mit den negativ-sortierten Zellen verglichen.

## **4.5 Einfluss der E-Cadherin-Expression auf die immunologische Erkennung durch Effektorzellen**

### **4.5.1 Nicht-MHC-restringierte Erkennung von E-Cadherin-Transfektanten**

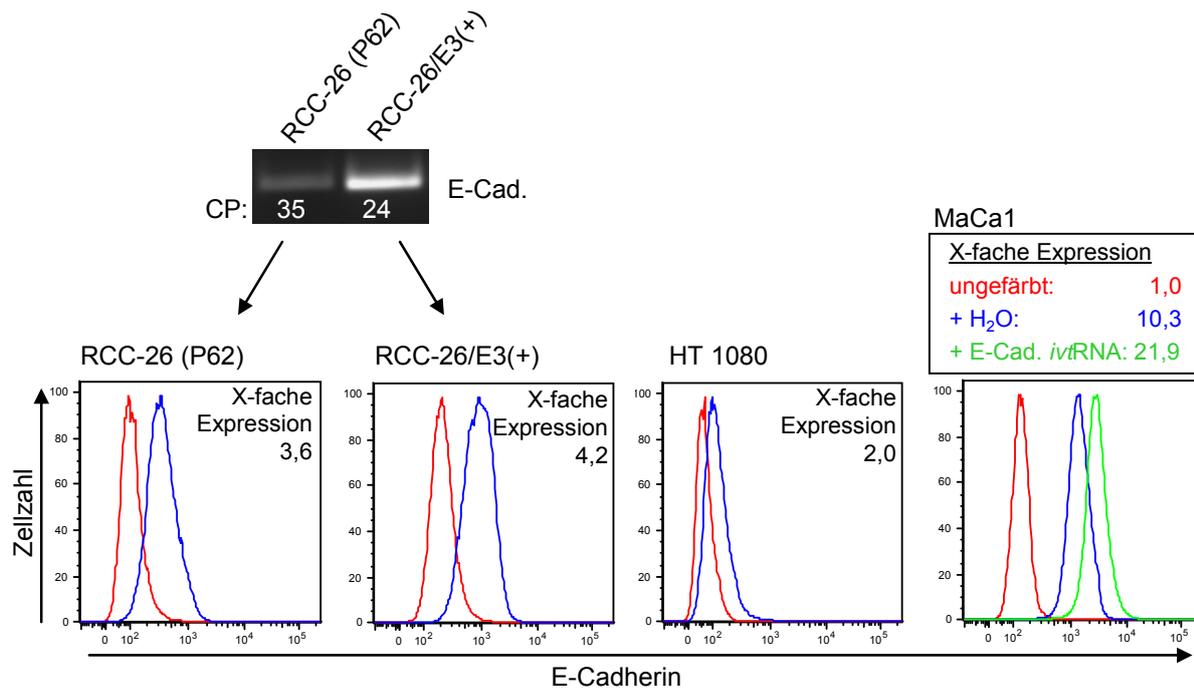
Die immunologische Erkennung des epithelialen und mesenchymalen Phänotyps spielt hinsichtlich einer Immun-Therapie des RCC eine entscheidende Rolle. Wie das Beispiel einer brasilianischen Studie zeigen konnte, ist es wichtig, alle Tumorzellen, auch wenn sie innerhalb desselben Tumors unterschiedliche Phänotypen aufweisen, in eine Therapie miteinzubeziehen. In dem besagten Fall wurde beobachtet, dass ein Patient mit einem klarzelligen RCC (G4) nach radikaler Nephrektomie und einer DC-Vakzinierung nach 3,5 Jahren einen rein sarkomatoiden Tumor ausbildete<sup>[180]</sup>. Unter diesem Aspekt sollte der Einfluss von E-Cadherin auf die immunologische Erkennung von LAK (lymphokine activated killer) -Zellen und NK-Zellen untersucht werden. Während die Funktion von T-Zellen über den MHC-Peptid-Komplex und über kostimulatorische Moleküle reguliert wird, werden NK-Zellen über ein Gleichgewicht von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren kontrolliert. E-Cadherin ist ein Ligand des inhibierenden Rezeptors KLRG1 (killer cell lektin-like rezeptor G1), der dem Schutz der Epithelien vor KLRG1-positiven Effektorzellen dient. Eine KLRG1-Expression wurde auf Effektor- und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (durchschnittlich 45 % CD8<sup>+</sup>- und 18 % CD4<sup>+</sup>-T-Zellen) und auf zytotoxischen CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen (50-80 %) von humanen, maturierten peripheren PBLs gefunden<sup>[167]</sup>. Folglich verliert eine Tumorzelle im Verlauf einer EMT durch den Verlust oder durch die Herunterregulation von E-Cadherin ein inhibitorisches Signal für KLRG1<sup>+</sup>-Effektorzellen. Eine Lyse der Tumorzellen durch KLRG1<sup>+</sup>-Effektorzellen wird demnach wahrscheinlicher.

Um den Einfluss von E-Cadherin auf die Effektorfunktion der unterschiedlichen zytotoxischen Zellen zu untersuchen, wurden die Zielzellen für eine differentielle Expression mit *ivt*RNA, kodierend für E-Cadherin, transfiziert. Neben der E-Cadherin-*ivt*RNA wurde als Kontrolle für eine generelle Oberflächenexpression von Molekülen die *ivt*RNA des kostimulatorischen Moleküls CD80 (B7.1) transfiziert und die zytotoxische Lyse durch die Effektorzellen jeweils mit Wasser-transfizierten Zellen verglichen. Um verschiedene Expressionsniveaus von E-Cadherin zu erhalten, wurden drei Zelllinien transfiziert. Zum einen RCC-26 (P61) und der für E-Cadherin positiv-sortierte Klon RCC-26/E3(+) und zum anderen K-562, eine MHC-Klasse-I-negative Erythroleukämie-Linie. Letztere diente als Positivkontrolle für eine optimale Erkennung durch NK- und LAK-Zellen sowie als Expressionskontrolle für die transfizierte *ivt*RNA, da diese Zellen generell gut elektroporierbar sind und eine gute Proteinexpression aufweisen. 15 h nach der Transfektion der *ivt*RNAs wurde die Oberflächenexpression in der FACS-Analyse überprüft (Abb.49). Erstaunlicherweise



**Abb.49: Expression der ivtRNA auf den Zielzellen, die für den <sup>51</sup>Cr-Freisetzungs-Versuch eingesetzt wurden.** RCC-26 (P62), RCC-26/E3(+) und K-562 wurden entweder mit 35 µg E-Cadherin oder 20 µg CD80 ivtRNA 15 h vor der Oberflächen-FACS-Analyse elektroporiert (siehe 3.8.2). Die X-fache Expression bezeichnet das Verhältnis der Marker-Expression nach Transfektion der ivtRNA zur ungefärbten Kontrolle, basierend auf der mittleren Fluoreszenz-Intensität (MFI).

wurde die ivtRNA für E-Cadherin in RCC-26 stärker exprimiert (6,8-fach) als in RCC-26/E3(+) (4,8-fach), obwohl die untransfizierte Zellen bei RCC-26/E3(+) etwas mehr Oberflächen-E-Cadherin-Expression besaßen, wobei der Unterschied auf Transkriptebene am deutlichsten war (11 Zyklen CP-Differenz) (Abb.50). Im Vergleich zu HT 1080, einer Fibrosarkom-Linie, die mit einer 2-fachen Oberflächenexpression im Vergleich zu ungefärbten Zellen kaum E-Cadherin exprimiert und zu MaCa1, die eine 10,3-fache Oberflächenexpression zeigte, die durch zusätzliche E-Cadherin-ivtRNA auf mehr als das Doppelte gesteigert werden konnte, war bei RCC-26 und RCC-26/E3(+) eine eher schwache E-Cadherin-Expression vorhanden. Im Vergleich zu den vorhergehenden Experimenten war die etwas stärkere E-Cadherin-



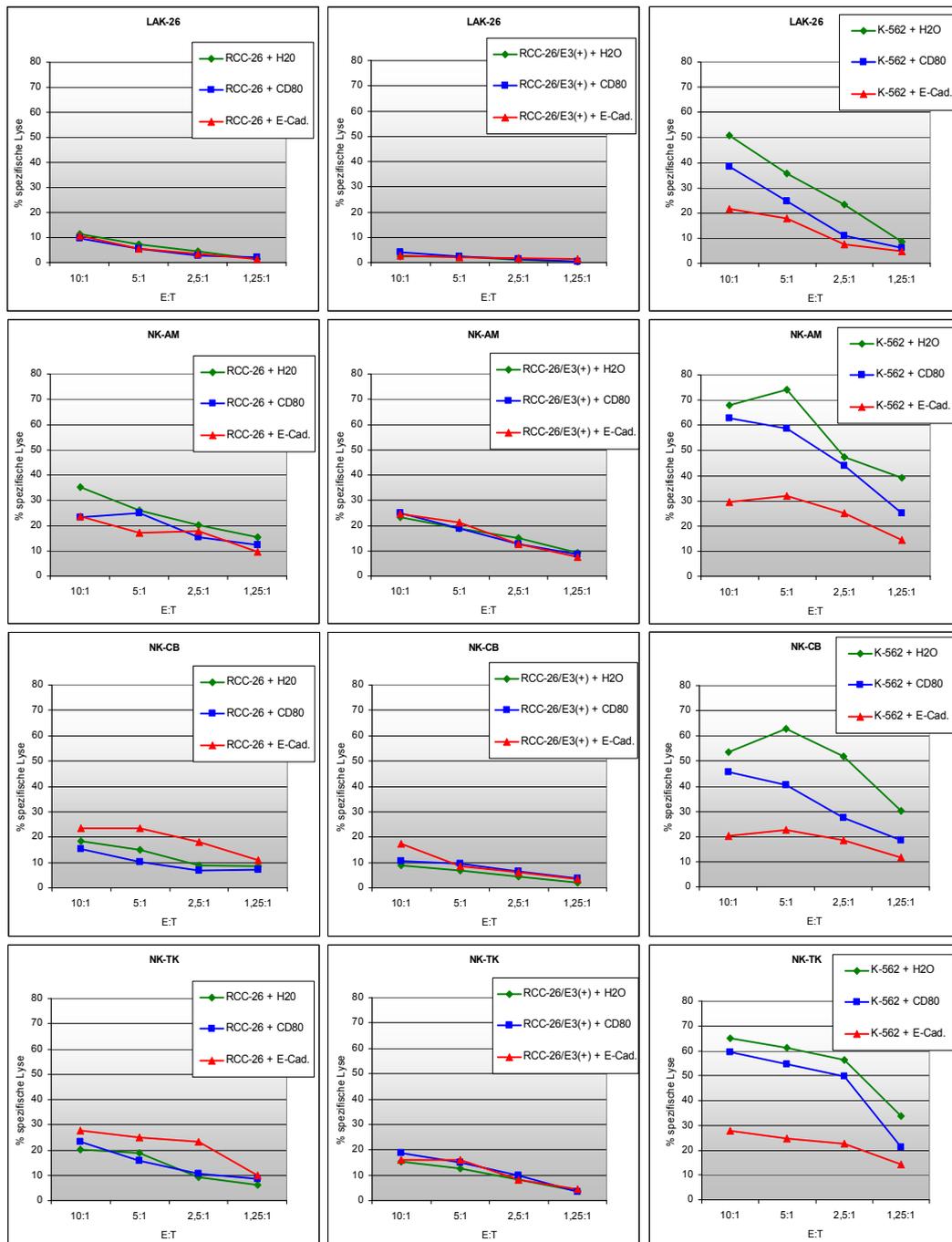
**Abb.50: Vergleich der mRNA- und Oberflächen-E-Cadherin-Expression zwischen RCC-26 (P62) und RCC-26/E3(+).** Die qRT-PCR-Analyse der E-Cadherin-Expression von RCC-26 (P62) und RCC-26/E3(+) (positiv-sortierter Klon) wurde mit der Oberflächen-E-Cadherin-Expression von RCC-26 (P62) und RCC26/E3(+) sowie von HT 1080 (Negativkontrolle) und MaCa1 (Positivkontrolle) verglichen. MaCa1 wurde zusätzlich mit 30 µg E-Cadherin *ivtRNA* elektroporiert (siehe 3.8.2) und 15 h später die Oberflächen-E-Cadherin-Expression mit der Wasser-Kontrolle verglichen. Die X-fache Expression bezeichnet das Verhältnis der E-Cadherin-Expression zur ungefärbten Kontrolle, basierend auf der mittleren Fluoreszenz-Intensität (MFI).

Expression auch auf den Wechsel von einem unmarkierten spezifischen E-Cadherin-Antikörper (Klon 180215, R&D) auf einen direkt-markierten spezifischen E-Cadherin-Antikörper (Klon 67A4, BioLegend) zurückzuführen, sowie auf den Wechseldes Fluoreszenzzytometers vom FACS<sup>TM</sup>-Calibur auf den sensitiveren LSR-II. Zudem könnten Zellkultur-Parameter, wie der Zeitpunkt der Subkultivierung, einen Einfluss haben.

Die *ivtRNA* für E-Cadherin wurde in K-562 sehr stark exprimiert (73-fach) (Abb.49), was zusammen mit der epithelialen Linie MaCa1, bei der die E-Cadherin-Expression durch E-Cadherin-*ivtRNA* verdoppelt werden konnte (Abb.50), dafür spricht, dass in RCC-26 die E-Cadherin-Expression aus bisher noch ungeklärten Gründen stark eingeschränkt ist und selbst nach Transfektion von E-Cadherin-*ivtRNA* keine deutliche Expressionssteigerung erreicht wurde. Diese Beobachtung kann auch nicht durch eine mangelnde Transfektionseffizienz begründet werden, da die *ivtRNA* für CD80 in RCC-26 sehr gut exprimiert wurde (202-fach), in RCC-26/E3(+) etwas schwächer, aber dennoch sehr gut (83-fach), wobei K-562 die stärkste CD80-Expression zeigte (548-fach) (Abb.49).

Die zytotoxische Aktivität der Effektorzellen gegen die mit E-Cadherin- und CD80-*ivtRNA*-transfizierten Tumorzellen wurde anschließend an die Oberflächenexpressionsanalyse (Abb.49) in einem Standard-<sup>51</sup>Cr-Freisetzungs-Versuch unter-

sucht (Abb.51). Dabei wurden durch IL-2 aktivierte NK-Zellen (300 IU/ml; 24 h) und LAK-Zellen eingesetzt. Die NK-Zellen von drei verschiedenen Spendern wurden mittels negativer Isolierung aus peripheren Blutlymphozyten (PBL) gewonnen und in der FACS-Analyse phänotypisiert (ohne Abb.) Der Anteil der CD56<sup>+</sup>- und/oder CD16<sup>+</sup>-Zellen konnte von ca. 39 % auf 97 % gesteigert werden und lag bei allen An-

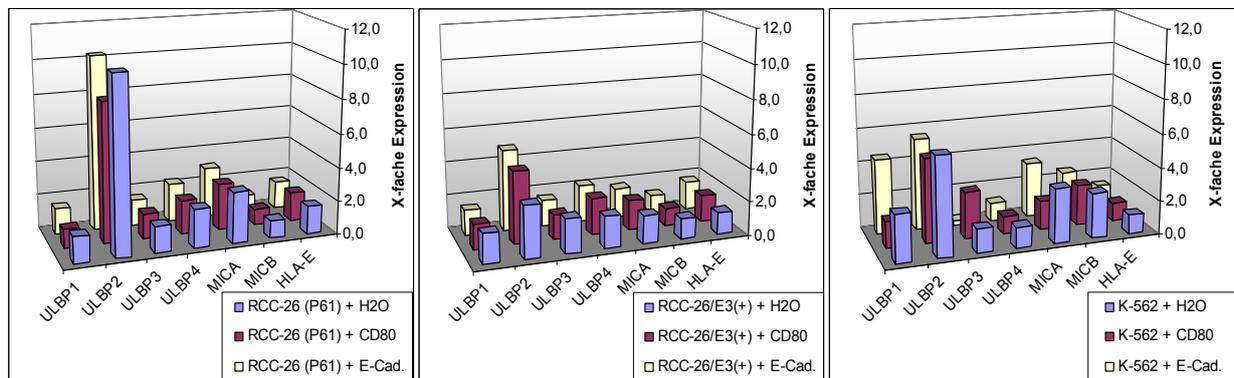


**Abb.51: Zytotoxische Aktivität von LAK- und NK-Zellen gegen mit E-Cadherin- und CD80-ivtRNA transfizierte Zielzellen im <sup>51</sup>Chrom-Freisetzungsversuch.** RCC-26, RCC-26/E3(+) und K-562 aus Abb.50 wurden 19 h nach Elektroporation mit E-Cadherin-ivtRNA, CD80-ivtRNA oder Wasser als Kontrolle mit radioaktivem <sup>51</sup>Chrom markiert und anschließend in den angegebenen Verhältnissen mit LAK-26-Zellen oder mit NK-Zellen, die durch negative Selektion von drei verschiedenen Spendern gewonnen wurden und 24 h vorher mit 300 IU/ml IL-2 aktiviert wurden, 4 h lang inkubiert. Das freigesetzte radioaktive <sup>51</sup>Chrom wurde gemessen und die spezifische Lyse in Prozent berechnet (siehe 3.12.2). E:T: Verhältnis der Effektorzellen zu den Target (Ziel) -Zellen

reicherungen zwischen 97 % und 99 %. Alle CD3<sup>+</sup>-Zellen wurden fast vollständig eliminiert. Der Anteil an KLRG1<sup>+</sup>-Zellen betrug bis zu 85 %. Zur Untersuchung der LAK-Effektorfunktion wurden LAK-26-Zellen verwendet. LAK-Zellen zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, eine Vielzahl von Tumorzellen auf nicht-MHC-restringierte Weise zu lysieren<sup>[162]</sup>. LAK-26 wurde *in vitro* durch Kultivierung mit hoher IL-2 Konzentration (1000 IU/ml) aus PBL des RCC-Patienten 26 gewonnen und setzt sich aus einer Mischpopulation zusammen, bestehend aus 2 % CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>-NK-Zellen, 45 % CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und 53 % CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (ohne Abb.). Da LAK-26 relativ spät nach der letzten Restimulation (17 Tage vorher) im <sup>51</sup>Cr-Freisetzung-Versuch eingesetzt wurde, konnte bei RCC-26 und RCC-26/E3(+) eine verhältnismäßig geringe zytotoxische Lyse beobachtet werden (Abb.51). Eine differentielle Erkennung der mit *ivtRNA*-transfizierten Zellen wurde nicht detektiert. Dafür wurden die transfizierten K-562-Zellen durch LAK-26 unterschiedlich stark lysiert, wobei die CD80-Expression auf K-562 zur verminderten Lyse führte und die E-Cadherin-transfizierten K-562-Zellen sogar noch weniger gut lysiert wurden (50 % spezifische Lyse bei der Wasser-Kontrolle und ca. 20 % bei den E-Cadherin-transfizierten Zellen bei einem E:T (Effektor zu Target) -Verhältnis von 10:1). Eine ähnliche differentielle Erkennung wurde auch bei K-562 durch die NK-Zellen von drei verschiedenen Spendern beobachtet. Generell fiel eine höhere spezifische Lyse im Vergleich zu den LAK-26-Zellen auf. Auch hier wurden die E-Cadherin-exprimierenden K-562-Zellen um mehr als die Hälfte schwächer lysiert und die CD80-transfizierten Zellen in allen Fällen schwächer als die Wasser-Kontrolle. Bei RCC-26 ergaben sich zwar geringe Unterschiede bei der Erkennung der unterschiedlich transfizierten Zellen durch die NK-Zellen, die jedoch aufgrund fehlender Konsistenz untereinander keine Aussage zuließen. RCC-26/E3(+) wurde zwar durch die drei verschiedenen NK-Zellen unterschiedlich stark lysiert, dabei hatte jedoch die CD80- oder E-Cadherin-Expression keinen Einfluss.

Da die CD80- und E-Cadherin-Expression zumindest bei K-562 zu einer verminderten zytotoxischen Lyse durch LAK- und NK-Zellen geführt hat, wurde überprüft, ob sich die Expression von aktivierenden oder inhibierende Liganden auf den Zielzellen durch die *ivtRNA*-Transfektion verändert hat (Abb.52). Unter den aktivierenden Liganden für NK-Zellen wurden ULBP1-4, MICA und MICB untersucht, die alle an den Rezeptor NKG2D binden. HLA-E ist der einzige untersuchte inhibierende Ligand und bindet auf NK-Zellen den Rezeptorkomplex CD94:NKG2A. Alle untersuchten Zellen zeigten keine großen Expressionsunterschiede für die NK-Liganden. Mit Ausnahme von ULBP2 wurden alle Liganden relativ schwach exprimiert, wobei ULBP2 auf RCC-26 deutlich stärker exprimiert wurde als bei RCC-26/E3(+) und K-562. Allein ULBP1 war auf den E-Cadherin-exprimierenden K-562-Zellen leicht stärker exprimiert als bei den mit Wasser-transfizierten Zellen. Ein größerer Einfluss von E-Cadherin und CD80 auf die Expression der untersuchten

Liganden und somit auf die Aktivität der Effektorzellen konnte demnach ausgeschlossen werden.



**Abb.53: Aktivierende und inhibierende Liganden auf den Zielzellen, die im <sup>51</sup>Chrom-Freisetzungs-Versuch eingesetzt wurden.** Die Ziellzellen aus dem <sup>51</sup>Chrom-Freisetzungs-Versuch (Abb.51/52) wurden mit spezifischen Antikörpern gegen ULBP1-4, MICA, MICB und HLA-E und einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Anti-Maus- oder Anti-Ratte-Antikörper gefärbt. Die X-fache Expression bezeichnet das Verhältnis der jeweiligen spezifischen Expression zur Isotyp-Kontrolle, basierend auf der mittleren Fluoreszenz-Intensität (MFI).

## 5 Diskussion

Die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) ist ein zentraler Mechanismus während der Embryogenese, der auch im Laufe der Tumorphyse in einigen Tumoren beobachtet werden kann. Bei der mit Tumorphyse assoziierten EMT wird ein Prozess durchlaufen, der es ruhenden epithelialen Zellen ermöglicht, durch Annahme eines mesenchymalen Phänotyps sich aus ihrem Zellverband zu lösen und die Basalmembran zu durchwandern. Dadurch gelangen Tumorzellen in das Blutgefäß- oder Lymphsystem und werden in entfernte Gewebe transportiert, wo sie durch den umgekehrten Prozess, die mesenchymale-epitheliale Transition (MET), neue Strukturen aufbauen können (Abb.3)<sup>[13]</sup>.

Um eine mögliche EMT im RCC näher charakterisieren zu können, wurde die Expression von EMT-assoziierten Molekülen *in vitro* sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene analysiert. Zudem wurde untersucht, ob potentielle EMT-Stimuli oder RCC-Therapeutika einen Einfluss auf den jeweiligen Phänotyp der Tumorzellen aufweisen bzw. ob dieser durch unterschiedliche Kulturbedingungen oder epigenetische Modulation beeinflusst werden kann. Da eine *in vitro*-Analyse nicht immer mit einer *in situ*-Situation verglichen werden kann, wurde die Expressionsanalyse von EMT-assoziierten Molekülen auf Gewebepräparate unterschiedlicher Tumorsubtypen und Differenzierungsstufen sowie in den meisten Fällen auch auf das nicht-tumoröse Nierenparenchym ausgeweitet. Dabei wurden einerseits mRNA-Expressionsuntersuchungen an kryokonservierten und Formalin-fixierten Gewebeproben durchgeführt, andererseits aber auch mit Hilfe der Immunhistochemie die Proteinexpression untersucht.

Der letzte Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, ob sich die immunologische Erkennung des epithelialen oder mesenchymalen RCC-Phänotyps durch Effektor-Zellen der nicht-MHC-restringierten Immunität unterscheidet und somit für den einen oder anderen Phänotyp ein Vorteil bzw. Nachteil in der Tumorphyse entsteht. Dazu wurde versucht, den mesenchymalen Phänotyp von RCC-Zellen mit Hilfe der transienten und stabilen Transfektion von Hypoxie-regulierten Molekülen, bzw. der Transfektion von E-Cadherin zum epithelialen Phänotyp zu „revertieren“.

### 5.1 Epithelialer und mesenchymaler Phänotyp von RCC-Zelllinien

Um einen Überblick über den „EMT-Status“ von RCC-Zellen *in vitro* zu bekommen, wurden 26 verschiedene RCC-Zelllinien sowie RPTEC („renal proximal tubular epithelial cell“) und Normalnierengewebe auf die mRNA-Expression (Abb.6, 9 und 11) und Proteinexpression (Abb.7, 8, 10 und 13) von typischen epithelialen und

mesenchymalen Markern hin untersucht. Aus allen Experimenten wurde deutlich, dass RCC-Zelllinien überwiegend einen mesenchymalen Phänotyp besitzen, da eine Oberflächen-E-Cadherin-Expression nur in seltenen Fällen beobachtet werden konnte, obwohl in einigen Zelllinien zumindest E-Cadherin-Transkripte nachweisbar waren (Abb.11). Mesenchymale Marker wie N-Cadherin und Snai1 wurden dagegen in allen etablierten Zelllinien exprimiert (Abb.11). Die Expression der E-Cadherin-Repressoren Snai1, Snai2 und SIP1 wurde zudem nach Kultivierung von RCC-26 in Spheroïden, dem kleinsten 3D-Kultivierungsmodell, etwas hochreguliert (Abb.16), was einen Hinweis darauf gibt, dass die Expression von E-Cadherin unter 3D-Kulturbedingungen anders reguliert sein könnte.

Die membranständige  $\beta$ -Catenin-Lokalisation in RCC-26 und RCC-53 spricht eher für einen intermediären Phänotyp, der sich zwischen einer mesenchymalen und einer epithelialen Stufe befindet. Auch bei der Betrachtung der Morphologie von RCC-Zelllinien konnten verschiedene Phänotypen beobachtet werden (Abb.12). Die unterschiedlichen Morphologien reichten von epithelial über fibroblastenartig bis hin zu einer unstrukturierten Morphologie. Tendenziell wurde ein Phänotyp gefunden, der sich eher auf der mesenchymalen Seite wiederfindet, jedoch auch über wenige epitheliale Merkmale verfügt. Somit konnte eine abgeschlossene EMT, einhergehend mit einem einheitlichen mesenchymalen RCC-Phänotyp *in vitro* nicht beobachtet werden. Auch Shimazui *et al.*<sup>[200]</sup> konnte eine komplexe Cadherin-Expression in RCC-Zelllinien nachweisen. N-Cadherin wurde in fast allen Zelllinien exprimiert, E-Cadherin hingegen auf Proteinebene in 30 % der Zelllinien, wobei nicht immer eine Korrelation zum morphologischen Phänotyp ersichtlich war, der von fibroblastoid bis epithelial eingestuft wurde. Der Anteil an E-Cadherin-negativen Zelllinien war im RCC wesentlich höher (70 %)<sup>[200]</sup> im Vergleich zu Zelllinien anderer epithelialen Tumoren (Kolonkarzinom (30 %)<sup>[201]</sup>, Blasenkarzinom (33 %)<sup>[202]</sup>, Mammakarzinom (55 %)<sup>[203]</sup>).

Des Weiteren wurde untersucht, ob Wachstumsfaktoren, die in anderen Tumoren oder während der Embryogenese bei einer EMT beteiligt sind, auch bei RCC-26 den Phänotyp weiter in die mesenchymale Richtung modulieren können. Eine EMT-induzierende Wirkung wurde für die Wachstumsfaktoren HGF, TGF- $\beta$ 1 bis 3, FGF-2, EGF und IGF-2 gefunden (siehe 2.2.3). In einem E-Cadherin-Reporter-Assay wurde untersucht, ob HGF, TGF- $\beta$ 1, FGF-2 und EGF die E-Cadherin-Expression in RCC-26 beeinflussen können. Dabei konnte die E-Cadherin-Promotor-Aktivität von allen Wachstumsfaktoren vermindert werden, wobei TGF- $\beta$ 1 am effektivsten war, FGF-2, HGF und EGF folgten in angegebener Reihenfolge (Abb.21). Dies konnte nach Stimulation von RCC-26 R1, einem Klon von RCC-26, der über eine geringe E-Cadherin-Expression verfügte, durch FGF-2 und HGF über einen Zeitraum von zehn Tagen bestätigt werden (Abb.17a). Auch in murinen distalen Tubuli-Epithelzellen induzierte TGF- $\beta$ 1 die stärkste E-Cadherin-Herunterregulierung, die zusätzlich durch

FGF-2 bzw. EGF verstärkt werden konnte<sup>[204]</sup>. Im Gegensatz dazu wurde nach zehntägiger FGF-2- oder HGF-Stimulation eine verstärkte WT1-Expression vorgefunden, die offensichtlich nicht ausreichte, um die E-Cadherin-Expression zu erhöhen (Abb.17b). Somit scheint das beschriebene Transaktivierungspotential von WT1 auf E-Cadherin zusätzlich von anderen Faktoren abhängig zu sein. Auch bei RCC-53 wurde trotz WT1-Expression keine E-Cadherin-Expression detektiert (zusätzliche Abb.1). Obwohl EGF die E-Cadherin-Promotor-Aktivität am wenigsten herunterregulieren konnte, wurde nach fünftägiger EGF-Stimulation von RCC-26 eine erhöhte Expression von Snai1, Snai2, MMP-2, MMP-9 und CA-IX detektiert, die zumindest durch zusätzliche TGF- $\beta$ 1-Stimulation weiter gesteigert werden konnte (Abb.18). Eine verstärkte Aktivität und Expression von MMP-2 und MMP-9 wurde in murinen Tubuli-Epithelzellen auch nach EGF-, FGF-2 und TGF- $\beta$ 1-Stimulation gezeigt<sup>[204]</sup>. Wie bereits erwähnt, wurde nach TGF- $\beta$ 1-Stimulation von RCC-26 R1 eine um die Hälfte verminderte E-Cadherin-Promotor-Aktivität (Abb.21) und eine um das zweifache herunterregulierte E-Cadherin-Expression gefunden (Abb.23).

TGF- $\beta$ 1 ist in RCC-26 im Vergleich zu RPTEC und dem NKC-Mix stark überexprimiert (Abb.19). Gleiches wurde auch in primären RCC-Zellen und bei RCC-Patienten gefunden und war mit einer schlechten Prognose assoziiert<sup>[205]</sup>. Nach neuntägiger TGF- $\beta$ 1-Stimulation von RCC-26, RPTEC und MDCK nahm vor allem die epitheliale Zelllinie MDCK eine spindelförmige Morphologie an (Abb.22). Dieser Effekt konnte auch bereits bei anderen epithelialen Zelllinien gezeigt werden<sup>[206,207]</sup>. Die Neutralisierung von TGF- $\beta$  im Kulturüberstand von RCC-26 zeigte keine Auswirkungen auf die Expression von EMT-assoziierten Molekülen (zusätzliche Abb.2).

Auffallend war jedoch das erhöhte Migrationspotential von RCC-26, das im Vergleich zu HGF und TGF- $\beta$ 1 durch FGF-2-Stimulation ausgelöst wurde (Abb.24). Gleiches konnte auch in murinen distalen und proximalen Tubuli-Epithelzellen gezeigt werden<sup>[204]</sup>. Parallel zur besseren Migrationsfähigkeit konnte auch eine starke CXCR4-Expression nach FGF-2-Stimulation beobachtet werden, was *in vivo* eine gerichtete Migration in CXCL12-exprimierende Gewebe ermöglicht<sup>[118]</sup> (Abb.26). Eine CXCR4-Expression konnte in humanen Mikrovesikel-Endothelzellen ebenfalls durch FGF-2 und zusätzlich durch VEGF induziert werden, was in Abhängigkeit von CXCR4 zur Neovaskularisierung beitrug<sup>[208]</sup>.

Zusammenfassend tragen alle untersuchten Wachstumsfaktoren auf unterschiedliche Weise zu einer EMT *in vitro* bei, sind aber alleine nicht in der Lage, eine volle EMT zu induzieren. Hinzu kommt, dass die meisten RCC-Zelllinien die E-Cadherin-Expression verloren hatten und somit eine volle EMT nicht untersucht werden konnte. Unter den komplexen *in vivo*-Bedingungen, denen eine Zelle im Tumor ausgesetzt ist, wäre es dennoch denkbar, dass durch ein geeignetes Milieu in

bestimmten Tumorarealen einige Zellen, sei es auch temporär, eine EMT durchlaufen können.

Für den Verlust von E-Cadherin wurden mehrere Mechanismen beschrieben (siehe 1.2.1). Darunter wurde eine epigenetische Herunterregulation von E-Cadherin durch Hypermethylierung des E-Cadherin-Promotors sowohl in RCC-Zelllinien als auch in ccRCCs *in situ* gezeigt<sup>[65,189]</sup>. Mit Hilfe des DNA-Methyltransferase-Inhibitors 5-Aza-2'-deoxycytidin (5-Aza-CdR) konnte für RCC-26 in dieser Arbeit eine Transkript-Reexpression von E-Cadherin erreicht werden (Abb.28), die jedoch nicht in einer Proteinexpression auf der Zelloberfläche resultierte (Abb.29). Obwohl die mit 5-Aza-CdR stimulierten RCC-26-Zellen eine rundlichere Morphologie annahmen, zeigten sie ein stärkeres Migrationspotential (Abb.30). Dessen Ursache wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt, da 5-Aza-CdR generell eher eine unspezifische epigenetische Transkriptomveränderung auslöst. Eine etwas schwächere E-Cadherin-Reexpression wurde auch nach Histon-Azetylierung durch Valproinsäure (VPA) beobachtet (Abb.31a/b). Zudem konnte die E-Cadherin-Reporter-Aktivität bei RCC-26 durch Stimulation mit VPA knapp verdoppelt werden (Abb.32 und zusätzliche Abb.3).

Neben E-Cadherin wurden drei weitere hypermethylierte Gene in RCC-26 gefunden (Abb.28). Diese waren WT1, VHL und CA-IX. Sowohl für WT1<sup>[209]</sup>, VHL<sup>[20]</sup> und CA-IX<sup>[210]</sup> wurde bereits im RCC eine Hypermethylierung *in vitro* und oder *in situ* beschrieben. WT1 ist ein Tumorsuppressorgen mit E-Cadherin-Transaktivierungspotential<sup>[88]</sup>, das in der adulten Niere nur in Podozyten exprimiert wird. So ist es nicht verwunderlich, dass ccRCCs keine WT1-Expression aufweisen. VHL und CA-IX haben dagegen eine bedeutende Rolle bei der Entstehung und Progression von ccRCCs. Dabei stellt eine Inaktivierung von VHL durch Hypermethylierung oder durch genetische Aberrationen einen entscheidenden Schritt dar. Die dadurch bedingte Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  ermöglicht eine Adaption der Tumorzellen an das hypoxische Tumormilieu, indem ein komplexes Hypoxie-Transkriptom aktiviert wird. Neben vieler anderer Prozesse findet eine Hochregulation von CA-IX durch HIF-1 $\alpha$  statt<sup>[41]</sup>, die mittels der reversiblen Hydroxylierung von Kohlenstoffdioxid zu Bicarbonat und Protonen<sup>[42,43]</sup> zur Ansäuerung des extrazellulären Milieus führt und somit zur Tumorprogression beiträgt<sup>[44,45]</sup>. Zudem ist CA-IX bei Prozessen der Zelladhäsion, Proliferation und Signaltransduktion beteiligt<sup>[46]</sup> (siehe auch 1.1.2).

*In vitro* scheint die Expression von CA-IX anders reguliert zu sein. Bei den Kurzzeit-kultivierten RCC-Primärzellen war auffallend, dass CA-IX nur von einer Primärzellkultur exprimiert wurde, die zusätzlich eine geringe Oberflächen-E-Cadherin-Expression aufwies (Abb.9). Da CA-IX ein Marker für das klarzellige RCC (ccRCC) ist, und alle anderen Primärzellen CA-IX-negativ waren, ist es denkbar, dass entweder nur wenige oder keine RCC-Zellen in der Kultur enthalten waren und diese

möglicherweise von Fibroblasten überwachsen wurden oder wahrscheinlicher, dass die Tumorzellen, bedingt durch den Wechsel vom Tumormilieu zum Zellkulturmilieu, die Expression verloren haben. Dennoch ist zu beachten, dass zumindest von RCC-26, RCC-36 und RCC-53 Langzeit-Kulturen etabliert werden konnten, wobei RCC-53 (ohne Abb.) und RCC-26 (Passage 19) CA-IX-positiv waren, jedoch RCC-26 nach weiterer Kultivierung zu Passage 129 hin die CA-IX-Expression verlor (Abb.15). Somit scheint ein Verlust der CA-IX-Expression durch Hypermethylierung des CA-IX-Promotors für das *in vitro*-Milieu eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Da bei der Therapie des RCCs immer mehr auf Kinase-Inhibitoren gesetzt wird, die in den Hypoxie-Signalweg eingreifen, wurden einige Vertreter dieser Inhibitoren zusammen mit IFN- $\alpha$  hinsichtlich einer Modulation der E-Cadherin-Expression untersucht, da dessen Reexpression in E-Cadherin-negativen Tumoren einer Metastasierung entgegen wirken könnte. Nach Inkubation der RCC-26-Zellen mit Sunitinib und Rapamycin wurden nur geringe Veränderungen der E-Cadherin-Promotor-Aktivität verzeichnet, bei IFN- $\alpha$  und stärker noch bei Sorafenib ging sie sogar zurück (Abb.33). Somit war keines der untersuchten RCC-Therapeutika in der Lage, eine Induktion der E-Cadherin-Expression auszulösen. Dennoch konnte in einem Ratten-Modell zur Untersuchung der Nierenfibrose eine TGF- $\beta$ 1-induzierte E-Cadherin-Herunterregulation durch Rapamycin verhindert werden<sup>[211]</sup>. In humanen Leberkarzinom-Zelllinien konnte sogar eine Oberflächen-E-Cadherin-Expression durch IFN- $\alpha$  induziert werden<sup>[212]</sup>. Auch in einer Transitionalzellkarzinom-Zelllinie der Blase erreichte Slaton *et al.*<sup>[213]</sup> eine Normalisierung des Expressionsverhältnis von MMP-9 zu E-Cadherin durch IFN- $\alpha$ , was zum einen indirekt auf die Herunterregulation von FGF-2 zurückzuführen ist, gleichzeitig aber auch auf den direkten Einfluss von IFN- $\alpha$  auf den MMP-9-Promotor. Die Herunterregulation von MMP-9 und die erhöhte Expression von E-Cadherin durch IFN- $\alpha$  führten in einem Maus-Modell zur Abnahme der Tumorgröße und konnten eine Metastasenbildung verhindern<sup>[214]</sup>. Somit ist zumindest indirekt eine Modulation der E-Cadherin-Expression durch Rapamycin und IFN- $\alpha$  in Abhängigkeit des Tumor-Modells möglich.

## 5.2 EMT-Status im RCC (*in situ*)

Im letzten Kapitel konnte gezeigt werden, dass der mesenchymal-intermediäre Phänotyp von RCC-Zelllinien durch verschiedene Stimuli weiter in Richtung mesenchymalen Phänotyp moduliert werden konnte. Wie aus aktuellen Publikationen hervorgeht, ist eine EMT *in vitro* und *in situ* in verschiedenen Tumortypen durch jeweils unterschiedliche Mechanismen möglich (Übersichtsartikel<sup>[215]</sup>). Häufig werden dabei EMT-induzierende Signalwege durch Wachstumsfaktoren reguliert, auf die

bereits eingegangen wurde (siehe 1.2.3). Dabei spielt auch die Art der Signalwirkung von Wachstumsfaktoren eine Rolle. So wurde beispielsweise in Mammakarzinom-, Prostatakarzinom- und Leberkarzinom-Zellen ein Wechsel von einer parakrinen zu einer autokrinen TGF- $\beta$ -Signalwirkung hin gefunden, die auch *in situ* wiedergefunden werden konnte<sup>[216,217]</sup>.

Eine EMT *in vitro* bzw. *in situ* wurde in Verbindung mit dem Mammakarzinom, Kolonkarzinom, Magenkarzinom<sup>[218]</sup> Prostatakarzinom, Blasenkarzinom, Hautkarzinom, Lungenkarzinom, Leberkarzinom und dem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals Bereiches (HNSCC - Head and neck squamous cell carcinoma)<sup>[219]</sup> diskutiert. Dabei handelt es sich um Karzinome, die ihre E-Cadherin-Expression beibehalten haben<sup>[13]</sup>. Da der zelluläre Ursprung von renalen Karzinomen noch nicht vollständig geklärt ist, könnte auch die Expression von Cadherinen komplexer als in anderen Tumoren sein. Im adulten Nierengewebe wird E-Cadherin nur schwach bzw. granulär zytoplasmatisch von den proximalen Tubulizellen exprimiert, dafür membranständig und granulär zytoplasmatisch von den Zellen der distalen Tubuli, dem dünnen Teil der Henle'schen Schleife und des Sammelrohrs<sup>[22]</sup>. Eine N-Cadherin-Expression ist auf die proximalen Tubuli beschränkt<sup>[220]</sup>. Nach Shimazui *et al.*<sup>[221]</sup> ist es nicht verwunderlich, dass nur eine Minderheit von ccRCCs, die aus Epithelzellen proximaler Tubuli entstehen, eine E-Cadherin-Expression aufweisen. Die Autoren interpretieren eine positive E-Cadherin-Expression im ccRCC als eine aberrante Regulation der Zelladhäsion während der Tumorentstehung. Dennoch besteht eine positive Korrelation zwischen dem Verlust der E-Cadherin-Expression und einem fortgeschrittenen Tumorstadium<sup>[222]</sup>. Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit in einer ersten mRNA-Analyse für vier verschiedene Tumorsubtypen der Niere mit zum Teil unterschiedlichem Tumorgrad *in situ* bestätigt werden (Abb.34). Für diese Untersuchung standen verschiedene kryokonservierte Gewebepreparate zur Verfügung. Zum einen Proben von renalen Onkozytomen (RO) und chromophoben RCCs (chRCC), die beide aus den distalen Tubuli der Niere entstehen, zum anderen von klarzelligigen RCCs (ccRCC) mit dem Tumorgrad G1 und G3-4 und papillären RCCs (pRCC), die ihren Ursprung in den proximalen Tubuli haben. Während die ROs und die chRCCs sowie die ccRCCs mit dem Tumorgrad G1 im Vergleich zum entsprechenden Normalnierenparenchym eine starke E-Cadherin-Expression zeigten, war in den ccRCCs mit dem Tumorgrad G3-4 und den pRCCs die E-Cadherin-Expression überwiegend schwach oder kaum vorhanden. Dafür wurde in diesen Tumoren eine erhöhte N-Cadherin-Expression gefunden, was einem Cadherin-Switch gleich kommen würde, vorausgesetzt, man geht von einer E-Cadherin-Expression im Anfangsstadium der Tumorentstehung aus, wie sie bei den ccRCCs (G1) beobachtet wurde. Letztere zeigten auch eine Koexpression von N-Cadherin, die bei den ROs und den chRCCs nur selten detektiert wurde.

Auch die Expression der drei wichtigsten E-Cadherin-Repressoren wurde in dieser Untersuchung analysiert. Ein direkter Einfluss von Snai1, Snai2 und SIP1 auf die E-Cadherin-Expression konnte allerdings nicht erkannt werden. Es zeichnete sich lediglich eine tendenziell stärkere Expression von Snai2 und SIP1 im Tumorgewebe der ccRCCs und den pRCCs ab. Dennoch wurde bei der immunhistochemischen Überprüfung dieser Ergebnisse - beispielhaft an je einem Tumor aus jeder Gruppe - in dem parallel vorhandenen sarkomatoiden Tumoranteil des ccRCC (G4) in vereinzelt Zellkernen eine geringe Snai1-Expression gefunden, die in den Zellkernen des klarzelligen Anteils nicht vorhanden war (Abb.37). Dies korrelierte auch mit der E-Cadherin-Expression, die im sarkomatoiden Anteil fehlte, im klarzelligen Anteil jedoch vorhanden war. Möglicherweise befinden sich diese Zellen in einem Anfangsstadium der EMT. Die Expressionsverhältnisse der mRNA-Analyse (Abb.34) und der immunhistochemischen Analyse (Abb.37) stimmten weitgehend miteinander überein, auch wenn nicht immer das erwartete Expressionsprofil erhalten wurde. So wurde z.B., entgegen der Tendenz, im klarzelligen G1-Tumor eine geringe E-Cadherin-Proteinexpression gefunden, dagegen im klarzelligen G4-Tumor eine starke E-Cadherin-Expression. Dennoch war dieses Ergebnis konsistent mit der Transkriptexpression, bei der die gleichen Expressionsverhältnisse detektiert wurden (Abb.37b). Auch in der Literatur wurden unterschiedliche Expressionsmuster von E-Cadherin im ccRCC gefunden, was eine komplexe Regulation vermuten lässt. Oft wurde eine Koexpression von E- und N-Cadherin beschrieben und ein funktioneller Verlust von E-Cadherin in Tumoren fortgeschrittenen Stadiums vermutet<sup>[222-224]</sup>. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass Hypoxie-assoziierte Moleküle die Adhäsionsfähigkeit beeinträchtigen können. Das hypoxische Milieu im RCC ist ein wichtiger Faktor bei der Tumorentstehung und -progression (siehe 1.1.2). Dabei ist die CA-IX-Expression häufig ein Indikator für ein hypoxisches Tumormilieu. Zudem wird CA-IX eine Rolle bei der funktionellen Inhibierung der Adhäsionsfähigkeit von E-Cadherin zugeschrieben<sup>[87]</sup>. Da CA-IX in allen klarzelligen und in 8/10 der papillären RCCs überexprimiert war, wäre eine verminderte Adhäsionsfähigkeit durch E-Cadherin denkbar (Abb.35). Auch für weitere Hypoxie-induzierbare Gene konnte eine Überexpression gefunden werden, wie z.B. für VEGF, das in den meisten klarzelligen RCCs überexprimiert war, was entsprechend der Literatur bestätigt werden konnte<sup>[225]</sup>. Des Weiteren wurden der HGF-Rezeptor MET und Cyclin D1 in mehreren RCC-Subtypen überexprimiert, MMP-7 nur in den pRCCs und den ccRCCs (G3-4). Eine MET-Expression in nicht-papillären RCCs deutet auf ein aggressives Potential hin<sup>[226]</sup>. Die Hypoxie-regulierte MMP-2 jedoch scheint im ccRCC nicht überexprimiert zu sein. Auch für MMP-9 wurde bei einem Tumor aus einer Gruppe von drei ccRCC (G3-4) sowie bei RCC-53, jedoch nicht bei RCC-26, ein höheres Transkriptexpressionsniveau gefunden (Abb.36). Auch in anderen Studien wurde für MMP-9 eine erhöhte Expression und Aktivität im ccRCC gefunden, was mit einer

schlechten Prognose verknüpft war<sup>[227,228]</sup>. Ähnlich sah es bei der Expression des Migrations-Chemokins CXCR4 in ccRCCs aus. Bei 6/7 Tumoren wurde CXCR4 im Vergleich zum Normalnierengewebe überexprimiert (zusätzliche Abb.4). Durch die CXCR4-Expression ist es metastasierenden Zellen möglich, in Richtung CXCL12-sezernierende Gewebe zu wandern. Dies ist ein bekannter Mechanismus für die gerichtete Migration<sup>[117,229]</sup> (siehe 1.2.2).

Aufgrund der komplexen Expression von Adhensionsmolekülen, E-Cadherin-Repressoren und Hypoxie-assoziierten Molekülen in den verschiedenen RCC-Subtypen konnten einige Voraussetzungen für eine EMT beobachtet werden, die jedoch für eine vollständige EMT *in situ* nicht ausreichten bzw. weiteren Expressionsanalysen bedürfte. Dennoch wurde aufgrund dieser Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit das Interesse auf das sarkomatoide RCC geweckt, da bei diesem Differenzierungsstadium im Vergleich zum ccRCC die E-Cadherin-Expression bei allen Tumoren herunterreguliert war.

Sarkomatoide Zellen treten im ccRCC häufig als verstreute Bereiche auf, teils auch vereinzelt zwischen epithelialen Zellen, können aber auch größere Tumorareale bilden. Für die mRNA-Analyse von EMT-assoziierten Molekülen wurden sechs rein sarkomatoide Tumoren der Niere analysiert, wobei von zwei Tumoren auch jeweils ein separater klarzelliger Tumoranteil vorhanden war, der einen Vergleich zwischen sarkomatoiden und klarzelligen Anteilen zuließ (Abb.38, 39 und zusätzliche Abb.6). Aufgrund der CA-IX-Expression konnte vermutet werden, dass ein weiterer sarkomatoider Tumor klarzelligen Ursprungs ist, die drei übrigen CA-IX-negativen Tumoren möglicherweise aber ihren Ursprung in einem chRCC oder RO haben. Die Expressionsdifferenz der untersuchten Moleküle betrug zwischen den sarkomatoiden und klarzelligen Pärchen in der Regel nicht mehr als die achtfache-Transkriptmenge (~3 CP-Werte). Somit wurden zumindest bei den beiden Tumor-Pärchen keine grundlegenden Expressionsunterschiede gefunden. Auffallend war jedoch, dass die CA-IX-positive Gruppe auch VEGF stärker exprimierte, HIF-3 $\alpha$ 4 und MMP-2 dagegen wurden schwächer exprimiert. Eine Überexpression von VEGF in beiden Anteilen wurde bereits immunhistochemisch nachgewiesen<sup>[225]</sup>. Auch eine Herunterregulation von HIF-3 $\alpha$ 4 im ccRCC ist bekannt<sup>[37]</sup>, wodurch das hypoxische Milieu im Tumor aufrecht erhalten werden kann. Die E-Cadherin-Repressoren Snai1, Snai2, SIP1, E12/E47 und  $\delta$ EF1 ließen keine differentielle Expression erkennen, weder bei den Pärchen noch zwischen den beiden CA-IX-Gruppen. Auch für VHL, WT1, MMP-7, MMP-9, HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und E-Cadherin ergaben sich keine wesentlichen Expressionsunterschiede, wobei innerhalb beider Gruppen größere Expressionsunterschiede für E-Cadherin gefunden wurden, nicht jedoch innerhalb der Pärchen. Somit konnte für die untersuchten Moleküle kein Einfluss bei der Differenzierung von ccRCCs zu sarkomatoiden RCCs bzw. ein Beitrag zur EMT beobachtet werden. Parallel zu diesen Untersuchungen wurden in unserer

Arbeitsgruppe für das ccRCC (G1 und G3-4), pRCC und RO anhand der kryokonservierten Gewebepräparate überexprimierte Tumor-assoziierte Antigene identifiziert. Dabei wurden für jeden Tumorsubtyp und Tumorgrad unterschiedliche Antigene gefunden, gegen die im Rahmen einer Immuntherapie spezifische T-Zellen mit Hilfe von RNA-beladenen dendritischen Zellen generiert werden sollen. Unter den selektierten überexprimierten Antigenen befanden sich auch die erwähnten Hypoxie-regulierten Gene CA-IX, VEGF, Cyclin D1, MET und MMP-7. Für alle außer MET (nicht untersucht) konnte gezeigt werden, dass es keine großen Expressionsunterschiede zwischen den sarkomatoiden und klarzelligen Anteilen innerhalb der CA-IX-positiven Gruppe gab (Abb.38, 39, zusätzliche Abb.6; Cyclin D1 ohne Abb.). Die Expression der weiteren, hier nicht genannten, RCC-assoziierten Antigene wird ebenfalls in beiden Anteilen untersucht werden, um bei der Auswahl der optimalen Antigene für eine Immuntherapie sicher zu gehen, dass beide Tumor-Varianten von den Antigen-spezifischen T-Zellen erkannt werden. Wie in einer Immuntherapie-Studie bereits gezeigt wurde, spielt dies gerade bei der sarkomatoiden Variante des RCCs eine bedeutende Rolle. In dieser Studie wurde beobachtet, wie ein Patient mit einem klarzelligen RCC (G4) nach radikaler Nephrektomie und einer DC-Vakzinierung nach 3,5 Jahren einen rein sarkomatoiden Tumor ausbildete<sup>[180]</sup>.

Mit Hilfe von immunhistologischen Färbungen der ccRCCs, die parallel zu ihrem klarzelligen Anteil einen sarkomatoiden Anteil enthielten (Abb.40), konnte ein besseres Bild über den EMT-Status *in situ* erhalten werden als bei den vorangegangenen Transkript-Analysen. Während E-Cadherin in 5/8 der klarzelligen Anteile exprimiert wurde, waren interessanterweise alle sarkomatoiden Bereiche E-Cadherin-negativ. Auch Kuroiwa *et al.*<sup>[22]</sup> fand bei lediglich 1/11 sarkomatoiden RCCs eine E-Cadherin-Expression, hingegen bei 10/11 RCCs eine E-Cadherin-Färbung im klarzelligen Bereich, wobei unter den 11 RCCs ein pRCC und ein RCC des Sammelrohrs enthalten waren. Für letztere ist eine E-Cadherin-Expression bekannt. Zumindest Snai1 schien aber für eine Herunterregulation von E-Cadherin nicht verantwortlich zu sein, da in keinem der Tumoren eine Snai1-Expression gefunden wurde. Wie bereits auch in einer vorangegangenen *in vitro*-Studie gezeigt wurde (Abb.10), konnte für beide Anteile in 8/9 Tumoren eine membranständige  $\beta$ -Catenin-Expression beobachtet werden. Kuroiwa *et al.*<sup>[22]</sup> zeigte jedoch, dass auch  $\beta$ -Catenin in den sarkomatoiden Komponenten herunterreguliert ist (1/11). Zudem konnte er keine onkogene nukleäre Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im RCC finden wie sie z.B. im Kolonkarzinom gefunden wurde<sup>[230]</sup>. Dies wurde auch von Kim *et al.*<sup>[231]</sup> sowie in der vorliegenden Arbeit für das RCC bestätigt. Bemerkenswert ist aber die nukleäre E-Cadherin-Lokalisation in 50 % beider Anteile. Erst vor kurzem wurde gezeigt, dass das durch die  $\gamma$ -Sekretase intrazellulär gespaltene C-terminale E-Cadherin-Fragment 2 (E-Cad./CTF2) durch das p120-Catenin in den Nukleus transportiert wird, wo es mit

dessen Hilfe spezifisch an DNA binden kann. DNA-Bindestellen für eine potentielle Transkription von Genen oder eine Funktion bei der Chromatin-Modifikation sind bisher noch nicht bekannt. Dennoch wurde ein Einfluss des E-Cad./CTF2-p120-Catenin-Komplexes auf die Apoptose und den p120-Kaiso-Signalweg beschrieben<sup>[232]</sup>. Auch eine funktionelle Inaktivierung von VHL durch genetische Aberrationen scheint spezifisch im ccRCC für eine nukleäre E-Cadherin-Expression verantwortlich zu sein<sup>[233]</sup>. Obwohl VHL in ca. 19 % der ccRCCs durch Hypermethylierung herunterreguliert ist<sup>[20]</sup>, konnte in allen klarzelligen Anteilen eine zytoplasmatische Expression gefunden werden, allerdings aber nur in einem Drittel der sarkomatoiden Anteile, was ungeachtet von genetischen Aberrationen für eine erhöhte „Verlust-Rate“ von VHL vor allem in sarkomatoiden Anteilen spricht. Ähnliches wurde für CA-IX gefunden. Auch hier exprimierte nur ein Drittel der sarkomatoiden Anteile CA-IX, hingegen waren fast alle klarzelligen Bereiche CA-IX-positiv. Tikoo *et al.*<sup>[225]</sup> fand dagegen in 68 % der sarkomatoiden RCCs eine CA-IX-Expression im Vergleich zu 86 % bei den ccRCCs. Dennoch ist zu beachten, dass eine CA-IX-Expression in ccRCCs mit einer guten Prognose verknüpft war<sup>[48,234]</sup>, wohingegen eine CA-IX-Expression in sarkomatoiden RCCs keinen prognostischen Hinweis lieferte. Kaum einen Unterschied fand er für die HIF-1 $\alpha$ -Expression mit weniger als 60 % in beiden Anteilen. In einer Western-Transfer-Studie von Turner *et al.*<sup>[235]</sup> war die Anzahl der HIF-1 $\alpha$ -positiven ccRCCs mit 77 % im Vergleich dazu etwas höher und die Anzahl der HIF-2 $\alpha$ -positiven ccRCCs war mit 79 % etwa gleich hoch. Zudem wurde bei einer VHL-Inaktivierung eine bevorzugte HIF-2 $\alpha$ -Expression beobachtet<sup>[7,235]</sup>. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit keine nukleäre HIF-2 $\alpha$ -Expression gefunden. Tikoo *et al.*<sup>[225]</sup> schlussfolgert aus seinen Studien, dass sarkomatoide ccRCCs auch aufgrund einer noch stärkeren VEGF-Expression im Vergleich zu ccRCCs das Hypoxie-Transkriptom des ccRCC, aus dem sie entstanden sind, übernommen haben und dieses an der Tumorprogression beteiligt ist. Außer für VEGF konnte dies in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Dennoch wurden gleichermaßen hohe Transkriptexpressionsniveaus für HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  in klarzelligen und sarkomatoiden Anteilen gefunden (zusätzliche Abb.6b). Für eine aufschlussreichere Aussage wäre eine größere Anzahl an Proben nötig gewesen sowie eine umfassendere immunhistochemische Analyse weiterer Hypoxie-Marker.

Auch eine Expression von WT1 und NY-ESO-1 wurde trotz positivem Kontrollgewebe nicht detektiert, was für NY-ESO-1 im RCC bereits gezeigt wurde<sup>[236]</sup>. Eine WT1-Expression im RCC wurde von Ordóñez<sup>[237]</sup> auch in anderen RCC-Subtypen, wie dem pRCC und dem chRCC, einschließlich dem sarkomatoiden RCC, nicht gefunden, mit der Ausnahme von 1/24 (4 %) der ccRCCs. Somit ist eine WT1-Expression im RCC zwar möglich, wird aber überwiegend, wie auch Muir *et al.*<sup>[238]</sup> zeigen konnte, nicht oder kaum gefunden.

Aufgrund der komplexen molekularen und phänotypischen Differenzierungsstadien beim Übergang von epithelialen Zellen zu mesenchymalen Zellen stellt sich grundsätzlich die Frage, ob eine EMT durch histologische Untersuchung in einigen Tumorentwicklungsstadien beobachtet werden kann, da es sich hierbei um einen transienten Prozess handelt, bei dem es möglicherweise nur sehr weniger Zellen bedarf, um an anderen Orten Metastasen bilden zu können. Im Gegensatz dazu gibt es auch Tumorstadien, in denen hoch maligne, invasive Zellen an der Tumorfront lokalisiert sind, wie sie beim Kolonkarzinom entdeckt wurden<sup>[13]</sup>. Für Gotzmann *et al.*<sup>[215]</sup> besitzen demnach Zellen, die *in vitro* eine EMT vollenden können, einen „eingefrorenen“ Phänotyp, der den transienten Übergang von Karzinomzellen zu invasiven, metastasierenden Zellen darstellt. Die Beobachtung, dass auch RCC-Metastasen in einigen Fällen eine Reexpression von E-Cadherin erlangen<sup>[239]</sup>, deutet ebenfalls darauf hin, dass es sich bei einer vollständigen EMT lediglich um einen kurzen Zeitraum handeln könnte, in dem alle Bedingungen für eine erfolgreiche Metastasierung erfüllt sein müssen.

### **5.3 *In vitro* MET durch Modulation der Proteinexpression von E-Cadherin und Hypoxie-regulierten Molekülen**

Ein hypoxisches Milieu in der Niere bildet die Grundlage für die Entstehung und die Progression des RCCs (siehe 1.1.2). Aufgrund des durch Hypoxiebedingungen induzierten Transkriptoms kann es zum Verlust von E-Cadherin kommen - unter anderem bedingt durch die Inaktivierung von VHL<sup>[8,9,84]</sup>. Wie bereits gezeigt wurde, ist eine E-Cadherin-Expression *in vitro* bei RCC-Zelllinien kaum zu finden. Durch Modulation des Hypoxie-Transkriptoms über Gentransfer, RNA-Inhibition und transienter Proteinexpression sollte herausgefunden werden, ob eine Reexpression von E-Cadherin auf diesem Weg möglich ist. Bei RCC-26 war VHL durch die Promotor-Hypermethylierung herunterreguliert (Abb.28), was auch im Vergleich zu RPTEC und RCC-53 deutlich wurde (Abb.41). Obwohl RCC-26 und RCC-53 entsprechend der molekulargenetischen Analyse von VHL funktionelles Protein exprimieren sollten, da jeweils ein Allel genetisch intakt war, wurden hohe Transkriptexpressionsniveaus für HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  gefunden, die sich auch in RPTEC wiederfinden ließen. Die hohe HIF-1 $\alpha$ -Transkriptexpression wurde bei RPTEC auch in einer Mikroarray-Studie gefunden und zumindest teilweise mit einer vergleichsweise starken transkriptionellen Antwort auf künstliche Hypoxiebedingungen in Verbindung gebracht. Mittels RNA-Inhibition (siRNA) von HIF-1 $\alpha$  konnte die Anzahl der Hypoxie-induzierten Gene stark verringert werden<sup>[240]</sup>.

In einem ersten Ansatz wurde untersucht, ob eine Reexpression von E-Cadherin durch die stabile Transfektion von VHL in den Klon RCC-26 R1 und somit eine Herunterregulation von HIF- $\alpha$  möglich ist (Abb.42). Tatsächlich konnte eine Transkriptexpression von E-Cadherin erreicht werden, die jedoch nicht auf Proteinebene zu finden war. Hinsichtlich dieser Beobachtung ist es erwähnenswert, dass bisher eine E-Cadherin-Proteinexpression in Folge einer VHL-Reexpression lediglich in VHL-defizienten Zelllinien beschrieben wurde, wobei die Degradation von HIF-1 $\alpha$  ein entscheidender Faktor war<sup>[8,9,84]</sup>. Durch die stabile Transfektion von VHL in RCC-26 R1 wurde auf Transkriptebene keine Regulation von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  beobachtet, da eine Degradation von HIF- $\alpha$  durch VHL vielmehr auf Proteinebene zu finden ist.

Bei dem zweiten Versuch, eine Expression von E-Cadherin durch Modulation des Hypoxie-Transkriptoms zu erreichen, wurde HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  in RCC-26 R1 durch siRNA herunterreguliert. Dabei konnte für HIF-2 $\alpha$  die Transkript-Menge vermindert werden, jedoch nicht für HIF-1 $\alpha$ , was möglicherweise an der mangelnden Spezifität der siRNA für HIF-1 $\alpha$  lag (Abb.43). In beiden Fällen blieb die E-Cadherin-Transkriptexpression unverändert. Das Gleiche wurde beobachtet, als RCC-26 R1 transient mit *ivt*RNA für HIF-3 $\alpha$ 4 transfiziert wurde (Abb.44). Trotz der Tatsache, dass der Transkriptionsfaktor HIF-3 $\alpha$ 4 eine Herunterregulation von HIF-1 $\alpha$ <sup>[37]</sup> und HIF-2 $\alpha$ <sup>[241]</sup> auf Transkriptebene induziert, wurde auch auf diesem Weg keine Modulation der HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$ -Expression erreicht.

Als letzte Möglichkeit wurde untersucht, ob eine E-Cadherin-Expression in RCC-26 durch stabile Transfektion der E-Cadherin-cDNA erreicht werden kann. Auf diesem Weg gelang auf einigen RCC-Zellen eine Oberflächenexpression (Abb.45). Um innerhalb der Transfektanten ein einheitliches molekulares Transkriptom für eine spätere Analyse der immunologischen Erkennung durch Effektorzellen zu bekommen, wurden drei Klone von RCC-26/E-Cadherin selektiert. Davon besaß einer der Klone, RCC-26/E3, trotz starker Transkriptexpression mit lediglich 8 % die meisten E-Cadherin-positiven Zellen (Abb.46). Nach einer Anreicherung dieser Zellen nahm der prozentuale Anteil der E-Cadherin-exprimierenden Zellen von ca. 81 % zwei Wochen nach der Selektion über einen Zeitraum von ca. vier Monaten so weit ab, dass alle Zellen E-Cadherin-negativ waren (Abb. 47), obwohl noch zehn Wochen nach der Anreicherung auf einigen Zellen eine starke Oberflächenexpression gefunden wurde (Abb.48). Somit war eine stabile Expression von E-Cadherin trotz des Selektionsdrucks durch Antibiotika nicht möglich. Auch die stabile Transfektion der E-Cadherin-cDNA in RCC-26 R1 zeigte, dass trotz hoher Transkriptexpression (CP-Differenz -13 Zyklen zur Vektorkontrolle) so gut wie keine Proteinexpression zu finden war (Abb.46). Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass der Expressionsvektor für E-Cadherin in den Zellen über die Zeit verloren ging. Vermutlich sind andere Faktoren in RCC-26 beteiligt, die eine effiziente

Proteinexpression verhindern, wobei eine Oberflächenexpression grundsätzlich möglich ist, wie für einige Zellen von RCC-26/E3 gezeigt wurde.

#### **5.4 Vergleich der immunologischen Erkennung des epithelialen und mesenchymalen Phänotyps**

In letzter Zeit wurde bekannt, dass auch Cadherine als Liganden für Effektorzellen in Frage kommen. Da es während der EMT zu einem „Cadherin-Switch“ kommt, d.h. zu einem Wechsel von E-Cadherin zu N-Cadherin (siehe 1.2.1), könnte die immunologische Erkennung der Effektorzellen durch die unterschiedlichen Phänotypen beeinflusst werden. Der dafür verantwortliche Rezeptor KLRG1 wird auf NK-Zellen und T-Zellen exprimiert (siehe 4.5.1) und vermittelt bei der Interaktion mit E-Cadherin, im murinen System auch mit N-Cadherin, ein inhibitorisches Signal über die ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) -Domäne<sup>[164,242]</sup>. Cadherine sind in gesunden Epithelien in Zell-Zell-Kontakten lokalisiert (siehe 1.2.1), somit ist im Normalzustand eine Interaktion mit KLRG1<sup>+</sup>-Zellen unwahrscheinlich, es sei denn, NK-Zellen oder T-Zellen wandern durch diese Barrieren. Dabei muss KLRG1 mit der homophilen Bindung der E-Cadherin-Moleküle konkurrieren. In einer Entzündungssituation, vermittelt durch die angeborene Immunität, könnte eine KLRG1-Cadherin-Interaktion nicht-infizierte Zellen vor einer überschießenden Gewebeerstörung schützen<sup>[164,167,242]</sup>. In der Tumorsituation ist eine fehlende E-Cadherin-Expression für die metastasierende Zelle ein Nachteil, da somit zumindest ein inhibierendes Signal für KLRG1<sup>+</sup>-Effektorzellen weniger vorhanden ist. Ob das humane N-Cadherin ebenfalls ein vergleichbares inhibitorisches Signal vermitteln kann, ist bisher noch unbekannt.

Um eine differentielle Erkennung des mesenchymalen und epithelialen Phänotyps durch LAK- und NK-Zellen zu untersuchen, wurden RCC-26 und RCC-26/E3(+) mit *ivtRNA* für E-Cadherin transfiziert (Abb.49). Die E-Cadherin-transfizierten Zellen repräsentieren in diesem Fall den epithelialen Phänotyp. Parallel dazu wurden als Positivkontrolle K-562-Zellen transfiziert. Um zusätzlich eine Kontrolle für die Transfektion und die Oberflächenexpression der *ivtRNA* zu bekommen, wurde separat die *ivtRNA* für CD80 transfiziert. Auf allen Zellen konnte eine starke CD80-Expression nachgewiesen werden. Auch die *ivtRNA* für E-Cadherin wurde in K-562 sehr gut exprimiert (73-fache Expression), in RCC-26 und RCC-26/E3(+) jedoch konnte die E-Cadherin-Expression nur wenig gesteigert werden (6,8-fach bzw. 4,9-fach). Auch hier zeigte sich erneut, dass in RCC-26/E3(+) trotz hoher E-Cadherin-Transkriptexpression nur eine leicht höhere Proteinexpression als in RCC-26 zu finden war (3,6-fach bzw. 4,2-fach) (Abb.50), was im Vergleich zur mesenchymalen Fibrosarkom-Linie HT 1080 (2-fach) lediglich einer Verdopplung der Expression

entsprach. Da in RCC-26/E3(+) in früheren Passagen bereits eine Oberflächen-E-Cadherin-Expression gefunden wurde, hätte erwartet werden können, dass zumindest einige Zellen in der Lage sind, durch zusätzliche E-Cadherin-*ivtRNA* diese auf der Oberfläche zu exprimieren. Selbst in einer epithelialen Zelllinie mit einer hohen E-Cadherin-Expression wie MaCa1 konnte die Oberflächenexpression verdoppelt werden, womit eine Limitierung bei der Prozessierung und Verankerung in der Zellmembran im Adhensionskomplex ausgeschlossen werden konnte (Abb.50). Somit war der größte E-Cadherin-Expressionsunterschied, abgesehen von K-562, in RCC-26 zu finden, mit einer 3,6-fachen Expression bei der Wasser-Kontrolle im Vergleich zur 6,8-fachen Expression bei den mit E-Cadherin-*ivtRNA*-transfizierten Zellen (Abb.49). Dies reichte jedoch nicht aus, um im <sup>51</sup>Cr-Freisetzungs-Versuch eine einheitliche differentielle Erkennung durch LAK-26 oder durch IL-2-aktivierte NK-Zellen von drei verschiedenen Spendern zu beobachten (Abb.51). Trotz der guten CD80-Expression auf den mit CD80-*ivtRNA*-transfizierten RCC-26- und RCC-26/E3(+)-Zellen blieb die zytotoxische Lyse durch die LAK- und NK-Zellen innerhalb der gegebenen Varianzen. Das Gleiche wurde auch für den MHC-restringierte T-Zell-Klon TIL-26, der aus dem Tumor des ccRCC-Patienten 26 gewonnen wurde, beobachtet (ohne Abb.). Trotz der E-Cadherin- bzw. CD80-Expression von RCC-26 und RCC-26/E3(+) wurde keine differentielle Erkennung durch TIL-26 detektiert. K-562-Zellen wurden aufgrund der fehlenden MHC-Expression nicht lysiert. Eine unterschiedliche Erkennung durch die nicht-MHC-restringierten Effektorzellen zeichnete sich dagegen bei den transfizierten K-562-Zellen ab. Hier wurden die CD80-transfizierten Zellen immer etwas weniger lysiert als die mit Wasser-transfizierten Zellen. Dieses Ergebnis war nicht überraschend, da bereits gezeigt wurde, dass der aktivierende CD80-CD28- und der inhibierende CD80-CTLA-4-Signalweg im Gegensatz zum murinen System bei ruhenden und IL-2-aktivierten NK-Zellen keine Rolle spielt, da weder CD28, noch CTLA-4 auf diesen Zellen exprimiert wurde<sup>[243,244]</sup>. Möglichweise gibt es dennoch bisher unbekannte Rezeptoren auf NK-Zellen oder LAK-Zellen, die mit CD80 interagieren können und ein inhibitorisches Signal vermitteln.

Für die E-Cadherin-exprimierenden K-562-Zellen wurde mindestens beim E:T (Effektor zu Target) -Verhältnis von 10:1 eine Abnahme der zytotoxischen Lyse um mehr als 50 % beobachtet. Einen Einfluss der *ivtRNA* für E-Cadherin oder CD80 auf die Expression von aktivierenden (ULBP1-4, MICA, MICB) oder inhibierenden (HLA-E) Liganden auf den Zielzellen wurde nicht beobachtet (Abb.53). Somit ist die inhibierende Wirkung von E-Cadherin auf die KLRG1-Expression der Effektorzellen zurückzuführen, wie bereits von Schwartzkopff *et al.*<sup>[164]</sup> in einem Blockierungsversuch von KLRG1 gezeigt wurde.

Hinsichtlich einer KLRG1-Expression auf Effektorzellen trägt eine Therapie des RCCs mit Sorafenib oder IFN- $\alpha$  zu einer zytotoxischen Lyse der Tumorzellen bei, da

---

IFN- $\alpha$  und noch stärker Sorafenib die E-Cadherin-Promotor-Aktivität vermindern konnten (Abb.33), was zu einem Verlust eines inhibitorischen Signals führte. Es stellt sich hier jedoch die Frage, welches physiologische Expressions-Verhältnis zwischen E-Cadherin und KLRG1 über eine Inhibierung von Effektorzellen entscheidet. Eine Antwort auf diese Frage wird sich jedoch erst in weiteren Versuchen finden. Dazu soll unter anderem die Oberflächen-E-Cadherin-Expression von frisch präparierten Tumorzellen, die nicht in Kultur genommen wurden, in der FACS-Analyse untersucht werden, um sie mit der *in vitro* Expression von E-Cadherin-transfizierten und nicht-transfizierten RCC-Zelllinien und K-562-Zellen vergleichen zu können. Somit lässt sich abschätzen, ob der E-Cadherin-KLRG1-Signalweg *in vivo* eine entscheidende Rolle spielt. Des Weiteren bleibt die Frage, ob N-Cadherin die Rolle von E-Cadherin übernehmen kann und welche Expressionsverhältnisse dafür entscheidend sind.

## 6 Zusammenfassung

Die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) nimmt während der Tumorprogression eine bedeutende Rolle ein und wurde bereits für mehrere Tumorarten beschrieben. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine EMT auch im RCC beobachtet werden kann und wenn ja, wie diese auf molekularer Ebene *in vitro* und *in situ* charakterisiert ist und inwieweit sich die immunologische Erkennung von mesenchymalen bzw. epithelialen RCC-Phänotypen durch Effektorzellen verändert.

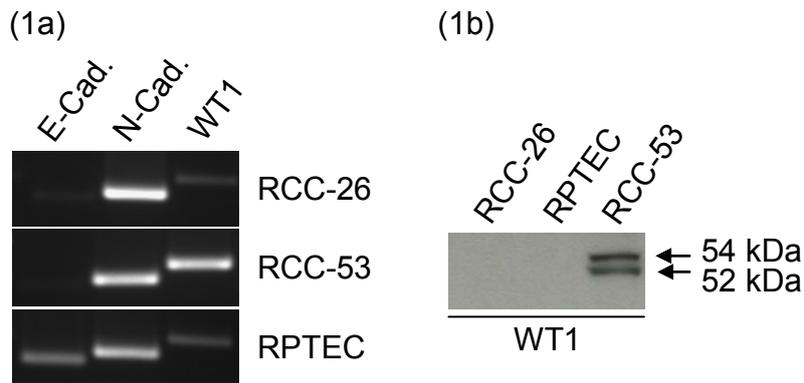
Aufgrund der Beobachtung, dass RCC-Zelllinien ihre epithelialen Merkmale überwiegend verloren haben und somit einen mesenchymalen oder eher intermediären Phänotyp besitzen, lässt sich vermuten, dass diese Zellen eventuell in einem fortgeschrittenen Stadium der EMT „eingefroren“ sind. Da fast alle untersuchten RCC-Zelllinien ihre Oberflächen-E-Cadherin-Expression verloren haben, war es nicht möglich, eine vollständig induzierte EMT *in vitro* zu untersuchen. Dennoch konnte der intermediär-mesenchymale Phänotyp von RCC-26, einer RCC-Linie klarzelliger Ursprungs, durch die Stimulation mit Wachstumsfaktoren, besonders durch TGF- $\beta$ 1, FGF-2 und EGF weiter in die mesenchymale Richtung verschoben werden. Dadurch erlangten die Zellen, neben einer leicht verstärkten Expression von Matrix-Metalloproteinasen, ein erhöhtes Migrationspotential und durch die CXCR4-Expression, die auch *in situ* zu beobachten war, eine molekulare Ausstattung für die gerichtete Migration. Insbesondere die Kombination mehrerer EMT-induzierender Wachstumsfaktoren konnte somit zumindest *in vitro* zu einer EMT beitragen.

Interessanterweise konnten aktuelle RCC-Therapeutika wie Kinase- oder mTOR-Inhibitoren sowie IFN- $\alpha$  die E-Cadherin-Promotor-Aktivität in RCC-26 nicht verstärken, sondern wirkten vielmehr hemmend auf die Promotor-Aktivität und förderten somit eher einen mesenchymalen RCC-Phänotyp.

Eine EMT *in situ* konnte bei ccRCC-Gewebeproben nur teilweise, bei der sarkomatoiden Variante des ccRCCs allerdings verstärkt beobachtet werden. Dennoch gab es zwischen beiden Varianten auf Transkriptebene keine größeren Unterschiede bezüglich der Expression von EMT- und Hypoxie-assoziierten Molekülen. Auf Proteinebene hingegen wurde in der sarkomatoiden Variante im Vergleich zum klarzelligen Bereich ein größerer Anteil an Tumoren gefunden, die einen Verlust der E-Cadherin-, VHL- und CA-IX-Expression zeigten. Bei beiden Varianten wurde dennoch eine membranständige, nicht aber nukleäre  $\beta$ -Catenin-Expression gefunden, wodurch eher ein intermediärer Phänotyp gekennzeichnet ist. Bisher bleibt die Frage offen, ob die nukleäre E-Cadherin-Expression, wie sie in etwa 50 % beider Anteile gefunden wurde, ein Transaktivierungspotential besitzt und inwieweit es zur Tumorprogression beiträgt.

Ein Mechanismus für die Herunterregulation von E-Cadherin stellt die Expression von E-Cadherin-Repressoren dar. Dieser Mechanismus scheint *in vitro* und *in situ* keine entscheidende Rolle zu spielen, vielmehr wurde zumindest für RCC-26 eine Hypermethylierung des E-Cadherin-Promotors gefunden. Das Gleiche wurde für den VHL-Promotor beobachtet, wodurch RCC-26 vermutlich unter einem künstlichen Hypoxie-Zustand stand, was an der hohen Expression von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  zu sehen war. Hypoxie-induzierte Gene, wie sie auch *in situ* nachgewiesen wurden (besonders im ccRCC und pRCC), sind an einer EMT maßgeblich beteiligt. Durch Modulation des Hypoxie-Transkriptoms wurde versucht, den umgekehrten Prozess, eine MET, *in vitro* zu induzieren. Durch die Rekonstitution von VHL, nicht aber von HIF-3 $\alpha$ , wurde eine E-Cadherin-Expression zwar auf Transkriptebene erreicht, jedoch nicht auf Proteinebene. Allein durch stabile und transiente Transfektion von E-Cadherin wurde eine Oberflächenexpression erreicht, die jedoch bei einem „stabilen“ Klon (RCC-26/E3(+)) mit steigender Passagen-Anzahl bis zum Verlust der Proteinexpression abnahm. Die transiente Expression der *ivt*RNA für E-Cadherin in RCC-26 bewirkte lediglich eine moderate Oberflächenexpression. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die Expression von E-Cadherin in K-562-Zellen zu einer um mehr als 50 % verminderten zytotoxischen Lyse durch IL-2-aktivierte humane NK- und LAK-Zellen führte, was auf ein inhibitorisches Signal des Rezeptors KLRG1 schließen lässt. Somit wird eine Erkennung und Lyse von E-Cadherin-negativen Zellen durch KLRG1<sup>+</sup>-Effektorzellen wahrscheinlicher.

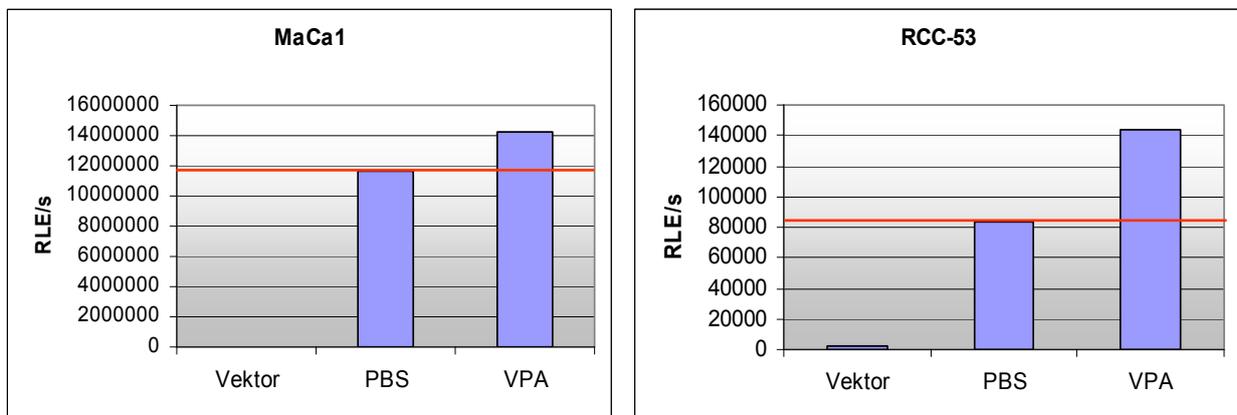
## 7 Zusätzliche Abbildungen



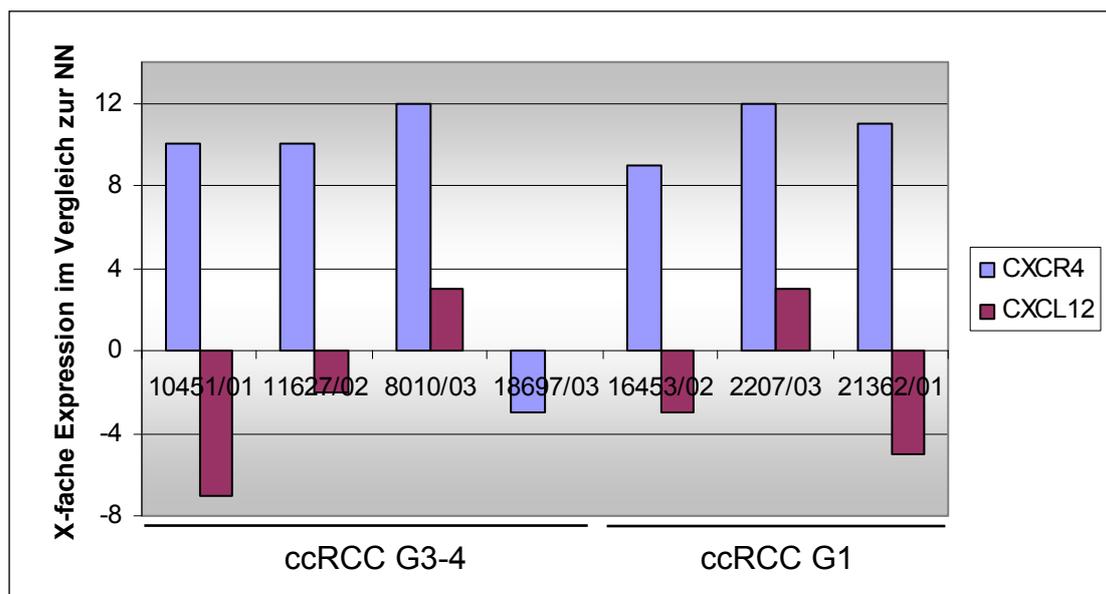
**Zusätzliche Abb.1: WT1-Expression auf mRNA- und Proteinexpressions-Ebene.** qRT-PCR-Expressionsanalyse (a) und Western-Transfer von WT1 (b). WT1 hat aufgrund von alternativen Spleißvarianten des fünften und neunten Exons vier Protein-Isoformen. Je zwei Isoformen verbergen sich hinter der 54 kDa- und 52 kDa-Bande.

$\alpha$ -TGF- $\beta$	Stunden	E-Cad.	N-Cad.	Snai1	Snai2	SIP1	CA-IX	WT1	CP-Wert	
-	10	(+)	++++	++	+++	+++	-	-	20 - 23	++++
+		-	++++	++	+++	+++	-	-	23 - 26	+++
-	24	-	++++	++	+++	+++	-	-	26 - 29	++
+		-	++++	++	+++	+++	-	(+)	29 - 32	+
									32 - 35	(+)
									35 - $\infty$	-

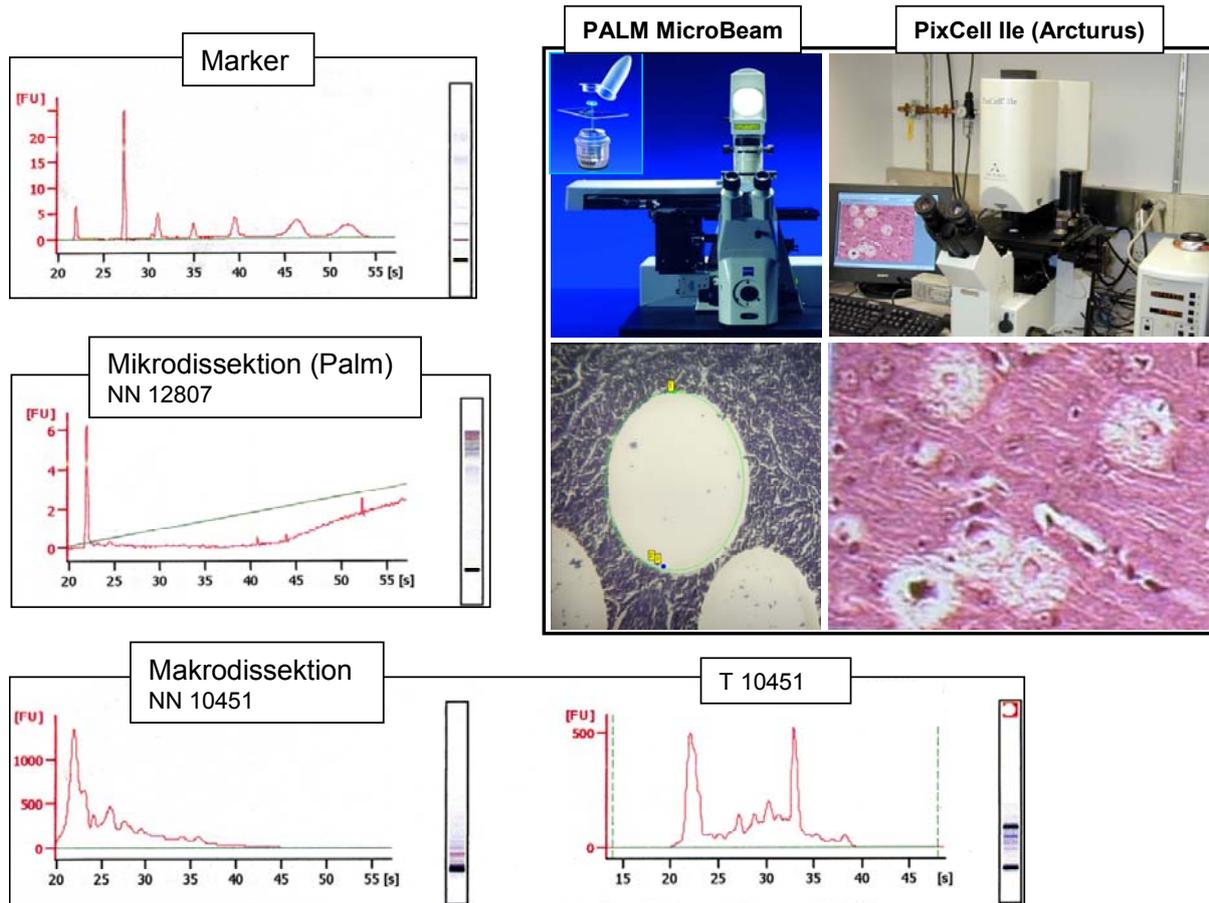
**Zusätzliche Abb.2: TGF- $\beta$ 1-Neutralisierung im Zellkulturmedium von RCC-26.** qRT-PCR-Expressionsanalyse von RCC-26 nach Kultivierung mit einem pan-spezifischen neutralisierenden Antikörper gegen TGF- $\beta$  (25  $\mu$ g/ml pro  $5 \times 10^5$  Zellen) über 10 und 24 h. CP-Werte wurden laut Legende bewertet.



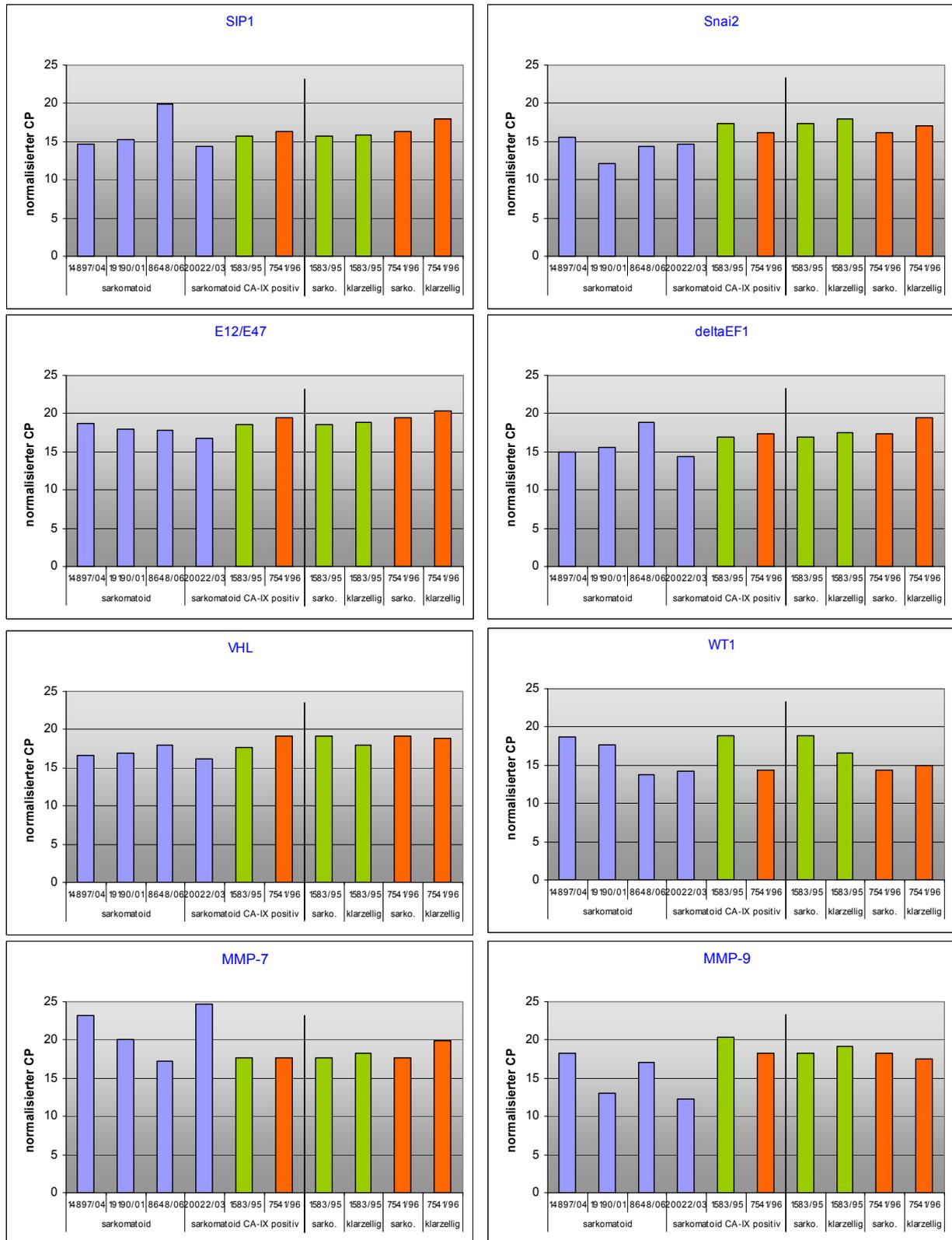
**Zusätzliche Abb.3: E-Cadherin-Reporter-Assay nach VPA-Stimulation.** Der Assay wurde wie in Abb.20 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurden die Zellen mit 1,5 mM VPA einen Tag vorher stimuliert. RLE/s: relative Lichteinheiten pro Sekunde



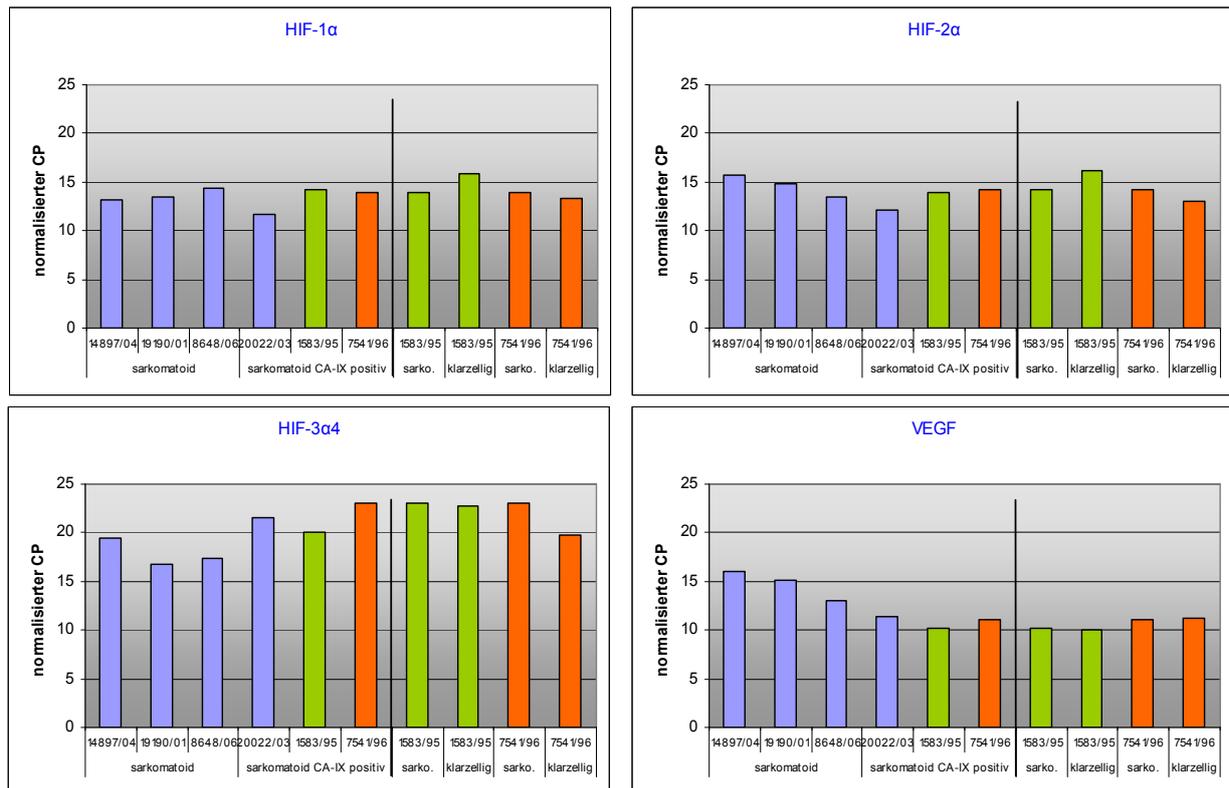
**Zusätzliche Abb.4: Vergleich der CXCR4- und CXCL12-mRNA-Expression zwischen ccRCCs mit dem Tumorgrad G3-4 mit ccRCCs mit dem Tumorgrad G1.** Die eingesetzten cDNAs wurden wie in Abb.34 hergestellt und verwendet. Dargestellt wurde die X-fache Überexpression des Tumors im Vergleich zur entsprechenden Normalniere (NN).



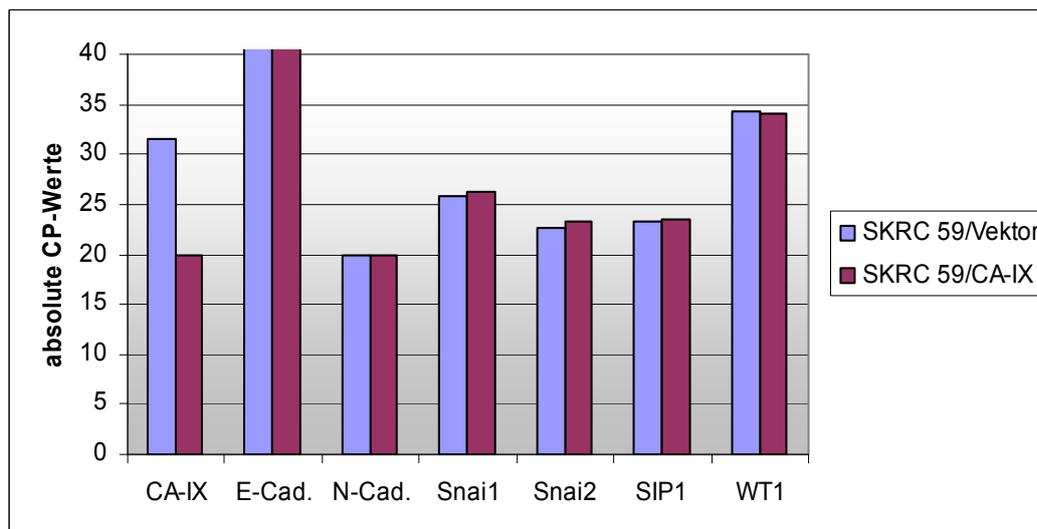
**Zusätzliche Abb.5: Analyse der RNA-Qualität einer Mikrodissektion mit dem MicroBeam und einer Makrodissektion.** Mikrodissektion wurde von 5  $\mu\text{m}$  dicken Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten mit dem MicroBeam und PixCell Ile durchgeführt. Die Makrodissektion erfolgte durch Abkratzen eines äquivalenten Tumorbereichs mit einem Skalpell. Beim MicroBeam wird der markierte Bereich mit einem Laser ausgeschnitten und mit einem zweiten Laserpuls in einen Auffangbehälter befördert. Im Vergleich dazu werden beim PixCell vordefinierte Kreise mit einem Laserpuls ausgestanzt und direkt an eine Membran gebunden. Die RNA-Qualitäts- und Quantitäts-Kontrolle erfolgte mit dem Bioanalyzer 2100 (Agilent). Dabei wurden unter anderem zwei Haushaltsgene amplifiziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt, dargestellt als Fluoreszenz über die Zeit. Eine intakte und reine RNA ist durch zwei klare Spitzen (18S-rRNA, 28S-rRNA) gekennzeichnet. Zusätzlich wird die Menge an RNA und dessen Integrität gemessen und berechnet (RIN-Nummer).



**Zusätzliche Abb.6a: mRNA-Expressions-Analyse von sechs sarkomatoiden und zwei entsprechenden klarzelligen Tumoren der Niere.** Die eingesetzten cDNAs wurden wie in Abb.38 beschrieben hergestellt. Die ersten drei Tumoren gehörten zur CA-IX-negative Gruppe, alle übrigen zur CA-IX-positiven Gruppe. Die rechten vier Balken eines jeden Diagramms beinhalten je zwei Pärchen (grün und orange) aus sarkomatoiden und klarzelligen Tumoren. Dargestellt wurden die durch ein Haushaltsgen normalisierten CP-Werte.



**Zusätzliche Abb.6b: mRNA-Expressions-Analyse von sechs sarkomatoiden und zwei entsprechenden klarzelligen Tumoren der Niere.** Die eingesetzten cDNAs wurden wie in Abb.38 beschrieben hergestellt. Die ersten drei Tumoren gehörten zur CA-IX-negative Gruppe, alle übrigen zur CA-IX-positiven Gruppe. Die rechten vier Balken eines jeden Diagramms beinhalten je zwei Pärchen (grün und orange) aus sarkomatoiden und klarzelligen Tumoren. Dargestellt wurden die durch ein Haushaltsgen normalisierten CP-Werte.



**Zusätzliche Abb.7: Stabile Expression von CA-IX in SKRC 59.** SKRC 59/CA-IX wurde im Vergleich zur stabilen Vektor-Transfektante auf die Transkriptexpression von EMT-assoziierten Genen hin untersucht. Dargestellt sind absolute CP-Werte.

## 8 Referenzen

1. Kaelin, W.G., Jr. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer* 2, 673-82 (2002).
2. Kaelin, W.G., Jr. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res* 13, 680s-684s (2007).
3. Carroll, V.A. & Ashcroft, M. Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. *Expert Rev Mol Med* 7, 1-16 (2005).
4. Thoenes, W. & Storkel, S. [Pathology of benign and malignant renal cell tumors]. *Urologe A* 30, W41-50 (1991).
5. Jakse, G. Uroonkologie (2007).
6. Rathmell, W.K. & Chen, S. VHL inactivation in renal cell carcinoma: implications for diagnosis, prognosis and treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* 8, 63-73 (2008).
7. Kapitsinou, P.P. & Haase, V.H. The VHL tumor suppressor and HIF: insights from genetic studies in mice. *Cell Death Differ* (2008).
8. Krishnamachary, B. et al. Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFHX1A, and ZFHX1B. *Cancer Res* 66, 2725-31 (2006).
9. Evans, A.J. et al. VHL promotes E2 box-dependent E-cadherin transcription by HIF-mediated regulation of SIP1 and snail. *Mol Cell Biol* 27, 157-69 (2007).
10. Obernder, R. et al. Nierenzellkarzinom. Manual Urogenitale Tumoren: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge (W. Zuckschwerdt Verlag, München, 2003).
11. Wheelock, M.J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y. & Johnson, K.R. Cadherin switching. *J Cell Sci* 121, 727-35 (2008).
12. Larue, L. & Bellacosa, A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* 24, 7443-54 (2005).
13. Thiery, J.P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2, 442-54 (2002).
14. Baumgarten, D.A., Smith, J.A. (2006).
15. Anding, R., Tan, K.H. & Walz, P.H. Bilateral Transitional Cell Carcinoma in Combination with Bilateral Renal Cell Carcinoma. *Aktuelle Urologie* 30, 426-429 (1999).
16. Vamvakas, S. et al. Renal cell cancer correlated with occupational exposure to trichloroethene. *J Cancer Res Clin Oncol* 124, 374-82 (1998).
17. Shapiro, J.A. et al. Hypertension, antihypertensive medication use, and risk of renal cell carcinoma. *Am J Epidemiol* 149, 521-30 (1999).
18. De Stefani, E. et al. Meat intake, 'mate' drinking and renal cell cancer in Uruguay: a case-control study. *Br J Cancer* 78, 1239-43 (1998).
19. Wittekind, C., Compton, C.C., Greene, F.L. & Sobin, L.H. TNM residual tumor classification revisited. *Cancer* 94, 2511-6 (2002).
20. Alleman, W.G. et al. The in vitro and in vivo effects of re-expressing methylated von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in clear cell renal carcinoma with 5-aza-2'-deoxycytidine. *Clin Cancer Res* 10, 7011-21 (2004).
21. Kaelin, W.G., Jr. The von hippel-lindau tumor suppressor protein: an update. *Methods Enzymol* 435, 371-83 (2007).
22. Kuroiwa, K., Konomoto, T., Kumazawa, J., Naito, S. & Tsuneyoshi, M. Cell proliferative activity and expression of cell-cell adhesion factors (E-cadherin, alpha-, beta-, and gamma-catenin, and p120) in sarcomatoid renal cell carcinoma. *J Surg Oncol* 77, 123-31 (2001).
23. Bannowsky, A. et al. [Sarcomatoid renal cell carcinoma. A rare and aggressive variation of primary renal cell carcinoma]. *Urologe A* 46, 406-11 (2007).
24. Storkel, S. et al. Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 80, 987-9 (1997).
25. Folkman, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 82, 4-6 (1990).
26. Stein, I., Neeman, M., Shweiki, D., Itin, A. & Keshet, E. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *Mol Cell Biol* 15, 5363-8 (1995).
27. Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. & Keshet, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359, 843-5 (1992).
28. Fukumura, D. & Jain, R.K. Tumor microenvironment abnormalities: causes, consequences, and strategies to normalize. *J Cell Biochem* 101, 937-49 (2007).

29. Iliopoulos, O., Ohh, M. & Kaelin, W.G., Jr. pVHL19 is a biologically active product of the von Hippel-Lindau gene arising from internal translation initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11661-6 (1998).
30. Hergovich, A., Lisztwan, J., Barry, R., Ballschmieter, P. & Krek, W. Regulation of microtubule stability by the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein pVHL. *Nat Cell Biol* 5, 64-70 (2003).
31. Schraml, P. et al. Relevance of nuclear and cytoplasmic von hippel lindau protein expression for renal carcinoma progression. *Am J Pathol* 163, 1013-20 (2003).
32. Kurban, G., Hudon, V., Duplan, E., Ohh, M. & Pause, A. Characterization of a von Hippel Lindau pathway involved in extracellular matrix remodeling, cell invasion, and angiogenesis. *Cancer Res* 66, 1313-9 (2006).
33. Los, M., Zeamari, S., Foekens, J.A., Gebbink, M.F. & Voest, E.E. Regulation of the urokinase-type plasminogen activator system by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Cancer Res* 59, 4440-5 (1999).
34. Maynard, M.A. & Ohh, M. Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia-inducible factor in kidney cancer. *Am J Nephrol* 24, 1-13 (2004).
35. Raval, R.R. et al. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol* 25, 5675-86 (2005).
36. Shinojima, T. et al. Renal cancer cells lacking hypoxia inducible factor (HIF)-1alpha expression maintain vascular endothelial growth factor expression through HIF-2alpha. *Carcinogenesis* 28, 529-36 (2007).
37. Maynard, M.A. et al. Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma. *FASEB J* 19, 1396-406 (2005).
38. Maynard, M.A. et al. Dominant-negative HIF-3alpha4 suppresses VHL-null renal cell carcinoma progression. *Cell Cycle* 6, 2810-6 (2007).
39. Ivanov, S.V. et al. Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12596-601 (1998).
40. Liao, S.Y., Aurelio, O.N., Jan, K., Zavada, J. & Stanbridge, E.J. Identification of the MN/CA9 protein as a reliable diagnostic biomarker of clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res* 57, 2827-31 (1997).
41. Grabmaier, K., MC, A.d.W., Verhaegh, G.W., Schalken, J.A. & Oosterwijk, E. Strict regulation of CAIX(G250/MN) by HIF-1alpha in clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene* 23, 5624-31 (2004).
42. Pastorek, J. et al. Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene* 9, 2877-88 (1994).
43. Swietach, P., Vaughan-Jones, R.D. & Harris, A.L. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev* 26, 299-310 (2007).
44. Ivanov, S. et al. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* 158, 905-19 (2001).
45. Martinez-Zaguilan, R. et al. Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 14, 176-86 (1996).
46. Dorai, T., Sawczuk, I.S., Pastorek, J., Wiernik, P.H. & Dutcher, J.P. The role of carbonic anhydrase IX overexpression in kidney cancer. *Eur J Cancer* 41, 2935-47 (2005).
47. Zatovicova, M. et al. Ectodomain shedding of the hypoxia-induced carbonic anhydrase IX is a metalloprotease-dependent process regulated by TACE/ADAM17. *Br J Cancer* 93, 1267-76 (2005).
48. Bui, M.H. et al. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clin Cancer Res* 9, 802-11 (2003).
49. Schock, F. & Perrimon, N. Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18, 463-93 (2002).
50. Christofori, G. New signals from the invasive front. *Nature* 441, 444-50 (2006).
51. Thiery, J.P. & Sleeman, J.P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 131-42 (2006).
52. Kalluri, R. & Neilson, E.G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 112, 1776-84 (2003).
53. Zoltan-Jones, A., Huang, L., Ghatak, S. & Toole, B.P. Elevated hyaluronan production induces mesenchymal and transformed properties in epithelial cells. *J Biol Chem* 278, 45801-10 (2003).

54. Balda, M.S. & Matter, K. Transmembrane proteins of tight junctions. *Semin Cell Dev Biol* 11, 281-9 (2000).
55. Tsukita, S., Furuse, M. & Itoh, M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 285-93 (2001).
56. Angst, B.D., Marcozzi, C. & Magee, A.I. The cadherin superfamily. *J Cell Sci* 114, 625-6 (2001).
57. Weis, W.I. & Nelson, W.J. Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum. *J Biol Chem* 281, 35593-7 (2006).
58. Wheelock, M.J. & Johnson, K.R. Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 207-35 (2003).
59. Peinado, H., Portillo, F. & Cano, A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* 48, 365-75 (2004).
60. Behrens, J., Frixen, U., Schipper, J., Weidner, M. & Birchmeier, W. Cell adhesion in invasion and metastasis. *Semin Cell Biol* 3, 169-78 (1992).
61. Hazan, R.B., Qiao, R., Keren, R., Badano, I. & Suyama, K. Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Y Acad Sci* 1014, 155-63 (2004).
62. Hazan, R.B., Kang, L., Whooley, B.P. & Borgen, P.I. N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma. *Cell Adhes Commun* 4, 399-411 (1997).
63. Hazan, R.B., Phillips, G.R., Qiao, R.F., Norton, L. & Aaronson, S.A. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 148, 779-90 (2000).
64. Hajra, K.M. & Fearon, E.R. Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 34, 255-68 (2002).
65. Nojima, D. et al. CpG methylation of promoter region inactivates E-cadherin gene in renal cell carcinoma. *Mol Carcinog* 32, 19-27 (2001).
66. Berx, G., Nollet, F. & van Roy, F. Dysregulation of the E-cadherin/catenin complex by irreversible mutations in human carcinomas. *Cell Adhes Commun* 6, 171-84 (1998).
67. Cadigan, K.M. & Nusse, R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11, 3286-305 (1997).
68. Fujita, Y. et al. Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol* 4, 222-31 (2002).
69. Palacios, F., Tushir, J.S., Fujita, Y. & D'Souza-Schorey, C. Lysosomal targeting of E-cadherin: a unique mechanism for the down-regulation of cell-cell adhesion during epithelial to mesenchymal transitions. *Mol Cell Biol* 25, 389-402 (2005).
70. Ino, Y., Gotoh, M., Sakamoto, M., Tsukagoshi, K. & Hirohashi, S. Dysadherin, a cancer-associated cell membrane glycoprotein, down-regulates E-cadherin and promotes metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 365-70 (2002).
71. Nam, J.S., Hirohashi, S. & Wakefield, L.M. Dysadherin: a new player in cancer progression. *Cancer Lett* 255, 161-9 (2007).
72. Cano, A. et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2, 76-83 (2000).
73. Batlle, E. et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2, 84-9 (2000).
74. Grootclaes, M.L. & Frisch, S.M. Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis. *Oncogene* 19, 3823-8 (2000).
75. Comijn, J. et al. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 7, 1267-78 (2001).
76. Perez-Moreno, M.A. et al. A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 276, 27424-31 (2001).
77. Nieto, M.A. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 155-66 (2002).
78. Bolos, V. et al. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* 116, 499-511 (2003).
79. Oda, H., Tsukita, S. & Takeichi, M. Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during Drosophila gastrulation. *Dev Biol* 203, 435-50 (1998).
80. Alexander, N.R. et al. N-cadherin gene expression in prostate carcinoma is modulated by integrin-dependent nuclear translocation of Twist1. *Cancer Res* 66, 3365-9 (2006).
81. Peinado, H., Ballestar, E., Esteller, M. & Cano, A. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol Cell Biol* 24, 306-19 (2004).

82. Savagner, P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays* 23, 912-23 (2001).
83. Barrallo-Gimeno, A. & Nieto, M.A. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132, 3151-61 (2005).
84. Esteban, M.A. et al. Regulation of E-cadherin expression by VHL and hypoxia-inducible factor. *Cancer Res* 66, 3567-75 (2006).
85. Baba, M. et al. Tumor suppressor protein VHL is induced at high cell density and mediates contact inhibition of cell growth. *Oncogene* 20, 2727-36 (2001).
86. Mohan, S. & Burk, R.D. von Hippel-Lindau protein complex is regulated by cell density. *Oncogene* 22, 5270-80 (2003).
87. Svastova, E. et al. Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin-mediated adhesion of MDCK cells via interaction with beta-catenin. *Exp Cell Res* 290, 332-45 (2003).
88. Hosono, S. et al. E-cadherin is a WT1 target gene. *J Biol Chem* 275, 10943-53 (2000).
89. Mitchison, T.J. & Cramer, L.P. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84, 371-9 (1996).
90. Zavadil, J. & Bottinger, E.P. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24, 5764-74 (2005).
91. Peverali, F.A. et al. Tumor cells secrete an angiogenic factor that stimulates basic fibroblast growth factor and urokinase expression in vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 161, 1-14 (1994).
92. Price, J.T., Bonovich, M.T. & Kohn, E.C. The biochemistry of cancer dissemination. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 32, 175-253 (1997).
93. Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A. & Chakraborti, T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 253, 269-85 (2003).
94. Parks, W.C., Wilson, C.L. & Lopez-Boado, Y.S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 4, 617-29 (2004).
95. Duffy, M.J., McGowan, P.M. & Gallagher, W.M. Cancer invasion and metastasis: changing views. *J Pathol* 214, 283-93 (2008).
96. Noe, V. et al. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci* 114, 111-118 (2001).
97. Nawrocki-Raby, B. et al. Upregulation of MMPs by soluble E-cadherin in human lung tumor cells. *Int J Cancer* 105, 790-5 (2003).
98. Nawrocki-Raby, B. et al. E-Cadherin mediates MMP down-regulation in highly invasive bronchial tumor cells. *Am J Pathol* 163, 653-61 (2003).
99. Sanceau, J., Truchet, S. & Bauvois, B. Matrix metalloproteinase-9 silencing by RNA interference triggers the migratory-adhesive switch in Ewing's sarcoma cells. *J Biol Chem* 278, 36537-46 (2003).
100. Jorda, M. et al. Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. *J Cell Sci* 118, 3371-85 (2005).
101. Radisky, D.C. et al. Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* 436, 123-7 (2005).
102. Jiang, Y., Goldberg, I.D. & Shi, Y.E. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* 21, 2245-52 (2002).
103. Wang, Z., Juttermann, R. & Soloway, P.D. TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *J Biol Chem* 275, 26411-5 (2000).
104. Lu, K.V., Jong, K.A., Rajasekaran, A.K., Cloughesy, T.F. & Mischel, P.S. Upregulation of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 promotes matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation and cell invasion in a human glioblastoma cell line. *Lab Invest* 84, 8-20 (2004).
105. Bajou, K. et al. Host-derived plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentration is critical for in vivo tumoral angiogenesis and growth. *Oncogene* 23, 6986-90 (2004).
106. Duffy, M.J. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. *Clin Chem* 48, 1194-7 (2002).
107. McCarthy, K. et al. High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 predict poor outcome in patients with breast cancer. *Int J Cancer* 84, 44-8 (1999).
108. Zeng, Z.S., Cohen, A.M., Zhang, Z.F., Stetler-Stevenson, W. & Guillem, J.G. Elevated tissue inhibitor of metalloproteinase 1 RNA in colorectal cancer stroma correlates with lymph node and distant metastases. *Clin Cancer Res* 1, 899-906 (1995).
109. Joo, Y.E. et al. Expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in gastric cancer. *Dig Dis Sci* 45, 114-21 (2000).
110. Fukata, S. et al. Levels of angiogenesis and expression of angiogenesis-related genes are prognostic for organ-specific metastasis of renal cell carcinoma. *Cancer* 103, 931-42 (2005).

111. Luzzi, K.J. et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 153, 865-73 (1998).
112. Koop, S. et al. Overexpression of metalloproteinase inhibitor in B16F10 cells does not affect extravasation but reduces tumor growth. *Cancer Res* 54, 4791-7 (1994).
113. Burger, J.A. & Kipps, T.J. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 107, 1761-7 (2006).
114. Ceradini, D.J. et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 10, 858-64 (2004).
115. Kucia, M. et al. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J Mol Histol* 35, 233-45 (2004).
116. Kucia, M. et al. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells* 23, 879-94 (2005).
117. Staller, P. et al. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* 425, 307-11 (2003).
118. Pan, J. et al. Stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis. *Mol Cancer* 5, 56 (2006).
119. Zagzag, D. et al. Stromal cell-derived factor-1alpha and CXCR4 expression in hemangioblastoma and clear cell-renal cell carcinoma: von Hippel-Lindau loss-of-function induces expression of a ligand and its receptor. *Cancer Res* 65, 6178-88 (2005).
120. Stoker, M. & Perryman, M. An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. *J Cell Sci* 77, 209-23 (1985).
121. Naldini, L. et al. Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J* 10, 2867-78 (1991).
122. Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E. & Vande Woude, G.F. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 915-25 (2003).
123. Koochekpour, S. et al. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene inhibits hepatocyte growth factor/scatter factor-induced invasion and branching morphogenesis in renal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 19, 5902-12 (1999).
124. Peruzzi, B., Athauda, G. & Bottaro, D.P. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product represses oncogenic beta-catenin signaling in renal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14531-6 (2006).
125. Pennacchietti, S. et al. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* 3, 347-61 (2003).
126. Lehmann, K. et al. Raf induces TGFbeta production while blocking its apoptotic but not invasive responses: a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells. *Genes Dev* 14, 2610-22 (2000).
127. Romano, L.A. & Runyan, R.B. Slug is an essential target of TGFbeta2 signaling in the developing chicken heart. *Dev Biol* 223, 91-102 (2000).
128. Kaartinen, V. et al. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet* 11, 415-21 (1995).
129. Kaminska, B., Wesolowska, A. & Danilkiewicz, M. TGF beta signalling and its role in tumour pathogenesis. *Acta Biochim Pol* 52, 329-37 (2005).
130. Janda, E. et al. Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol* 156, 299-313 (2002).
131. Grunert, S., Jechlinger, M. & Beug, H. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 657-65 (2003).
132. Ananth, S. et al. Transforming growth factor beta1 is a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor and a critical growth factor for clear cell renal carcinoma. *Cancer Res* 59, 2210-6 (1999).
133. Junker, U. et al. Transforming growth factor beta 1 is significantly elevated in plasma of patients suffering from renal cell carcinoma. *Cytokine* 8, 794-8 (1996).
134. Hegele, A. et al. TGF-beta1 in patients with renal cell carcinoma. *Urol Res* 30, 126-9 (2002).
135. Brown, K.A. et al. Induction by transforming growth factor-beta1 of epithelial to mesenchymal transition is a rare event in vitro. *Breast Cancer Res* 6, R215-31 (2004).
136. Okada, H., Danoff, T.M., Kalluri, R. & Neilson, E.G. Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Physiol* 273, F563-74 (1997).
137. Li, Y., Yang, J., Dai, C., Wu, C. & Liu, Y. Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis. *J Clin Invest* 112, 503-16 (2003).
138. Valles, A.M. et al. Acidic fibroblast growth factor is a modulator of epithelial plasticity in a rat bladder carcinoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1124-8 (1990).

139. Morali, O.G., Jouneau, A., McLaughlin, K.J., Thiery, J.P. & Larue, L. IGF-II promotes mesoderm formation. *Dev Biol* 227, 133-45 (2000).
140. Morali, O.G. et al. IGF-II induces rapid beta-catenin relocation to the nucleus during epithelium to mesenchyme transition. *Oncogene* 20, 4942-50 (2001).
141. Lee, J.G. & Kay, E.P. FGF-2-mediated signal transduction during endothelial mesenchymal transformation in corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 83, 1309-16 (2006).
142. Okada-Ban, M., Thiery, J.P. & Jouanneau, J. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol* 32, 263-7 (2000).
143. Butler, A.A. & LeRoith, D. Minireview: tissue-specific versus generalized gene targeting of the *igf1* and *igf1r* genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology* 142, 1685-8 (2001).
144. Zavadil, J., Cermak, L., Soto-Nieves, N. & Bottinger, E.P. Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO J* 23, 1155-65 (2004).
145. Postigo, A.A., Depp, J.L., Taylor, J.J. & Kroll, K.L. Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *EMBO J* 22, 2453-62 (2003).
146. Kondo, M. et al. A role for Id in the regulation of TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cell Death Differ* 11, 1092-101 (2004).
147. Kowanzet, M., Valcourt, U., Bergstrom, R., Heldin, C.H. & Moustakas, A. Id2 and Id3 define the potency of cell proliferation and differentiation responses to transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein. *Mol Cell Biol* 24, 4241-54 (2004).
148. Zeisberg, M. et al. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 9, 964-8 (2003).
149. Derynck, R. Transforming growth factor alpha. *Cell* 54, 593-5 (1988).
150. Yang, Z. et al. Pak1 phosphorylation of snail, a master regulator of epithelial-to-mesenchyme transition, modulates snail's subcellular localization and functions. *Cancer Res* 65, 3179-84 (2005).
151. Guo, W. & Giancotti, F.G. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 816-26 (2004).
152. Schendel, D.J. et al. Cellular and molecular analyses of major histocompatibility complex (MHC) restricted and non-MHC-restricted effector cells recognizing renal cell carcinomas: problems and perspectives for immunotherapy. *J Mol Med* 75, 400-13 (1997).
153. Van den Hove, L.E. et al. Phenotype, cytokine production and cytolytic capacity of fresh (uncultured) tumour-infiltrating T lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Clin Exp Immunol* 109, 501-9 (1997).
154. Thurnher, M. et al. Human renal-cell carcinoma tissue contains dendritic cells. *Int J Cancer* 68, 1-7 (1996).
155. Schleypen, J.S. et al. Cytotoxic markers and frequency predict functional capacity of natural killer cells infiltrating renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 12, 718-25 (2006).
156. Tomita, Y., Nishiyama, T., Fujiwara, M. & Sato, S. Characterization of tumor-infiltrating mononuclear cells in renal cell cancer: quantitative analysis by immunoperoxidase staining. *Urol Int* 47, 1-6 (1991).
157. Zinkernagel, R.M. & Doherty, P.C. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 251, 547-8 (1974).
158. Karre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G. & Kiessling, R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319, 675-8 (1986).
159. Balch, C.M. et al. Patterns of human tumor-infiltrating lymphocytes in 120 human cancers. *Arch Surg* 125, 200-5 (1990).
160. Rosenberg, S. Lymphokine-activated killer cells: a new approach to immunotherapy of cancer. *J Natl Cancer Inst* 75, 595-603 (1985).
161. Schleypen, J.S. et al. Renal cell carcinoma-infiltrating natural killer cells express differential repertoires of activating and inhibitory receptors and are inhibited by specific HLA class I allotypes. *Int J Cancer* 106, 905-12 (2003).
162. Falk, C.S., Noessner, E., Weiss, E.H. & Schendel, D.J. Retaliation against tumor cells showing aberrant HLA expression using lymphokine activated killer-derived T cells. *Cancer Res* 62, 480-7 (2002).
163. Khong, H.T. & Restifo, N.P. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 3, 999-1005 (2002).
164. Schwartzkopff, S. et al. Tumor-associated E-cadherin mutations affect binding to the killer cell lectin-like receptor G1 in humans. *J Immunol* 179, 1022-9 (2007).

165. Voehringer, D., Koschella, M. & Pircher, H. Lack of proliferative capacity of human effector and memory T cells expressing killer cell lectinlike receptor G1 (KLRG1). *Blood* 100, 3698-702 (2002).
166. Voehringer, D. et al. Viral infections induce abundant numbers of senescent CD8 T cells. *J Immunol* 167, 4838-43 (2001).
167. Ito, M. et al. Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. *J Exp Med* 203, 289-95 (2006).
168. Bottino, C. et al. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med* 198, 557-67 (2003).
169. Fuchs, A., Cella, M., Giurisato, E., Shaw, A.S. & Colonna, M. Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). *J Immunol* 172, 3994-8 (2004).
170. Oudard, S., George, D., Medioni, J. & Motzer, R. Treatment options in renal cell carcinoma: past, present and future. *Ann Oncol* 18 Suppl 10, x25-31 (2007).
171. Motzer, R.J. et al. Phase I/II trial of temsirolimus combined with interferon alfa for advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 25, 3958-64 (2007).
172. Staehler, M., Haseke, N., Schoeppler, G. & Stadler, T. Modern Therapeutic Approaches in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *EAU-EBU Update Series* 5, 26-37 (2007).
173. De Riese, W., Goldenberg, K., Allhoff, E. & Jonas, U. Spontaneous regression of metastatic renal carcinoma with long-term survival. *Br J Urol* 68, 98-100 (1991).
174. Whittington, R. & Faulds, D. Interleukin-2. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in patients with cancer. *Drugs* 46, 446-514 (1993).
175. Rosenberg, S.A. et al. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. *JAMA* 271, 907-13 (1994).
176. Atkins, M. et al. Carbonic anhydrase IX expression predicts outcome of interleukin 2 therapy for renal cancer. *Clin Cancer Res* 11, 3714-21 (2005).
177. Brouwers, A.H. et al. Interferons can upregulate the expression of the tumor associated antigen G250-MN/CA IX, a potential target for (radio)immunotherapy of renal cell carcinoma. *Cancer Biother Radiopharm* 18, 539-47 (2003).
178. Fishman, M. & Antonia, S. Novel therapies for renal cell carcinoma--an update. *Expert Opin Investig Drugs* 12, 593-609 (2003).
179. Avigan, D. Dendritic cell-tumor fusion vaccines for renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 10, 6347S-52S (2004).
180. Antunes, A.A., Dall'Oglio, M.F., Barbuto, J.A., Leite, K.R. & Srougi, M. Pure sarcomatous recurrence of clear cell renal carcinoma following radical nephrectomy and dendritic cell vaccination. *Sao Paulo Med J* 124, 161-2 (2006).
181. Smith, P.K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85 (1985).
182. Mullis, K.B. & Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-50 (1987).
183. Mühlhardt, C. *Molekularbiologie/Genomics* (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2002).
184. Uemura, H. et al. MN/CA IX/G250 as a potential target for immunotherapy of renal cell carcinomas. *Br J Cancer* 81, 741-6 (1999).
185. Zeisberg, M. & Kalluri, R. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med* 82, 175-81 (2004).
186. Xu, Z., Shen, M.X., Ma, D.Z., Wang, L.Y. & Zha, X.L. TGF-beta1-promoted epithelial-to-mesenchymal transformation and cell adhesion contribute to TGF-beta1-enhanced cell migration in SMMC-7721 cells. *Cell Res* 13, 343-50 (2003).
187. Yang, S.P. et al. Potential biological role of transforming growth factor-beta1 in human congenital kidney malformations. *Am J Pathol* 157, 1633-47 (2000).
188. Dumont, N., Bakin, A.V. & Arteaga, C.L. Autocrine transforming growth factor-beta signaling mediates Smad-independent motility in human cancer cells. *J Biol Chem* 278, 3275-85 (2003).
189. Costa, V.L. et al. Quantitative promoter methylation analysis of multiple cancer-related genes in renal cell tumors. *BMC Cancer* 7, 133 (2007).
190. Wilhelm, S.M. et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 64, 7099-109 (2004).
191. Ohnuma-Ishikawa, K. et al. Knockdown of XAB2 enhances all-trans retinoic acid-induced cellular differentiation in all-trans retinoic acid-sensitive and -resistant cancer cells. *Cancer Res* 67, 1019-29 (2007).

192. O'Farrell, A.M. et al. SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood* 101, 3597-605 (2003).
193. Bae-Jump, V.L., Zhou, C., Gehrig, P.A., Whang, Y.E. & Boggess, J.F. Rapamycin inhibits hTERT telomerase mRNA expression, independent of cell cycle arrest. *Gynecol Oncol* 100, 487-94 (2006).
194. Shimazui, T. et al. Prediction of in vitro response to interferon-alpha in renal cell carcinoma cell lines. *Cancer Sci* 98, 529-34 (2007).
195. Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J. & Schreiber, R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3, 991-8 (2002).
196. Teschendorff, A.E., Miremadi, A., Pinder, S.E., Ellis, I.O. & Caldas, C. An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. *Genome Biol* 8, R157 (2007).
197. Klatte, T. et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 13, 7388-93 (2007).
198. Cangiano, T. et al. Sarcomatoid renal cell carcinoma: biologic behavior, prognosis, and response to combined surgical resection and immunotherapy. *J Clin Oncol* 17, 523-8 (1999).
199. van Rhee, F. et al. NY-ESO-1 is highly expressed in poor-prognosis multiple myeloma and induces spontaneous humoral and cellular immune responses. *Blood* 105, 3939-44 (2005).
200. Shimazui, T., Girolodi, L.A., Bringuier, P.P., Oosterwijk, E. & Schalken, J.A. Complex cadherin expression in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 56, 3234-7 (1996).
201. Kinsella, A.R., Lepts, G.C., Hill, C.L. & Jones, M. Reduced E-cadherin expression correlates with increased invasiveness in colorectal carcinoma cell lines. *Clin Exp Metastasis* 12, 335-42 (1994).
202. Rieger, K.M. et al. Human bladder carcinoma cell lines as indicators of oncogenic change relevant to urothelial neoplastic progression. *Br J Cancer* 72, 683-90 (1995).
203. Pierceall, W.E., Woodard, A.S., Morrow, J.S., Rimm, D. & Fearon, E.R. Frequent alterations in E-cadherin and alpha- and beta-catenin expression in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 11, 1319-26 (1995).
204. Strutz, F. et al. Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int* 61, 1714-28 (2002).
205. Sievers, E. et al. Characterization of primary renal carcinoma cultures. *Urol Int* 79, 235-43 (2007).
206. Bakin, A.V., Rinehart, C., Tomlinson, A.K. & Arteaga, C.L. p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFbeta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *J Cell Sci* 115, 3193-206 (2002).
207. Valcourt, U., Kowanetz, M., Niimi, H., Heldin, C.H. & Moustakas, A. TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol Biol Cell* 16, 1987-2002 (2005).
208. Salcedo, R. et al. Angiogenic effects of prostaglandin E2 are mediated by up-regulation of CXCR4 on human microvascular endothelial cells. *Blood* 102, 1966-77 (2003).
209. Kleymenova, E.V., Yuan, X., LaBate, M.E. & Walker, C.L. Identification of a tumor-specific methylation site in the Wilms tumor suppressor gene. *Oncogene* 16, 713-20 (1998).
210. Ashida, S., Nishimori, I., Tanimura, M., Onishi, S. & Shuin, T. Effects of von Hippel-Lindau gene mutation and methylation status on expression of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 128, 561-8 (2002).
211. Wu, M.J. et al. Rapamycin attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis. *Kidney Int* 69, 2029-36 (2006).
212. Masuda, T. et al. Up-regulation of E-cadherin and I-catenin in human hepatocellular carcinoma cell lines by sodium butyrate and interferon-alpha. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 36, 387-94 (2000).
213. Miyake, H. et al. Basic fibroblast growth factor regulates matrix metalloproteinases production and in vitro invasiveness in human bladder cancer cell lines. *J Urol* 157, 2351-5 (1997).
214. Slaton, J.W. et al. Treatment with low-dose interferon-alpha restores the balance between matrix metalloproteinase-9 and E-cadherin expression in human transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res* 7, 2840-53 (2001).
215. Gotzmann, J. et al. Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis. *Mutat Res* 566, 9-20 (2004).
216. Ito, N. et al. Elevated levels of transforming growth factor beta messenger RNA and its polypeptide in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 51, 4080-3 (1991).
217. Park, B.J., Park, J.I., Byun, D.S., Park, J.H. & Chi, S.G. Mitogenic conversion of transforming growth factor-beta1 effect by oncogenic Ha-Ras-induced activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human prostate cancer. *Cancer Res* 60, 3031-8 (2000).

218. Becker, K.F. et al. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res* 54, 3845-52 (1994).
219. Mandal, M. et al. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features. *Cancer* (2008).
220. Tani, T., Laitinen, L., Kangas, L., Lehto, V.P. & Virtanen, I. Expression of E- and N-cadherin in renal cell carcinomas, in renal cell carcinoma cell lines in vitro and in their xenografts. *Int J Cancer* 64, 407-14 (1995).
221. Shimazui, T. et al. Alterations in expression of cadherin-6 and E-cadherin during kidney development and in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 38, 331-8 (2000).
222. Katagiri, A., Watanabe, R. & Tomita, Y. E-cadherin expression in renal cell cancer and its significance in metastasis and survival. *Br J Cancer* 71, 376-9 (1995).
223. Markovic-Lipkovski, J., Brasanac, D., Muller, G.A. & Muller, C.A. Cadherins and integrins in renal cell carcinoma: an immunohistochemical study. *Tumori* 87, 173-8 (2001).
224. Jin, T.X., Kakehi, Y., Moroi, S. & Yoshida, O. [E-cadherin expression and histopathological features in renal cell carcinomas]. *Hinyokika Kyo* 41, 653-7 (1995).
225. Tickoo, S.K. et al. Immunohistochemical expression of hypoxia inducible factor-1alpha and its downstream molecules in sarcomatoid renal cell carcinoma. *J Urol* 177, 1258-63 (2007).
226. Choi, J.S. et al. MET expression in sporadic renal cell carcinomas. *J Korean Med Sci* 21, 672-7 (2006).
227. Cho, N.H. et al. Increased expression of matrix metalloproteinase 9 correlates with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 44, 560-6 (2003).
228. Hagemann, T., Gunawan, B., Schulz, M., Fuzesi, L. & Binder, C. mRNA expression of matrix metalloproteases and their inhibitors differs in subtypes of renal cell carcinomas. *Eur J Cancer* 37, 1839-46 (2001).
229. Struckmann, K. et al. pVHL co-ordinately regulates CXCR4/CXCL12 and MMP2/MMP9 expression in human clear-cell renal cell carcinoma. *J Pathol* 214, 464-71 (2008).
230. Conacci-Sorrell, M. et al. Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol* 163, 847-57 (2003).
231. Kim, Y.S. et al. beta-catenin expression and mutational analysis in renal cell carcinomas. *Pathol Int* 50, 725-30 (2000).
232. Ferber, E.C. et al. A role for the cleaved cytoplasmic domain of E-cadherin in the nucleus. *J Biol Chem* (2008).
233. Gervais, M.L. et al. Nuclear E-cadherin and VHL immunoreactivity are prognostic indicators of clear-cell renal cell carcinoma. *Lab Invest* 87, 1252-64 (2007).
234. Patard, J.J. et al. Low CAIX expression and absence of VHL gene mutation are associated with tumor aggressiveness and poor survival of clear cell renal cell carcinoma. *Int J Cancer* (2008).
235. Turner, K.J. et al. Expression of hypoxia-inducible factors in human renal cancer: relationship to angiogenesis and to the von Hippel-Lindau gene mutation. *Cancer Res* 62, 2957-61 (2002).
236. Jungbluth, A.A. et al. Immunohistochemical analysis of NY-ESO-1 antigen expression in normal and malignant human tissues. *Int J Cancer* 92, 856-60 (2001).
237. Ordonez, N.G. The diagnostic utility of immunohistochemistry in distinguishing between mesothelioma and renal cell carcinoma: a comparative study. *Hum Pathol* 35, 697-710 (2004).
238. Muir, T.E., Cheville, J.C. & Lager, D.J. Metanephric adenoma, nephrogenic rests, and Wilms' tumor: a histologic and immunophenotypic comparison. *Am J Surg Pathol* 25, 1290-6 (2001).
239. Leroy, X. et al. Diffuse expression of MUC 1 in metastases of renal clear cell carcinoma as a possible therapeutic target for renal cancer. *Histopathology* 47, 435-6 (2005).
240. Chi, J.T. et al. Gene expression programs in response to hypoxia: cell type specificity and prognostic significance in human cancers. *PLoS Med* 3, e47 (2006).
241. Maynard, M.A. et al. Dominant-negative HIF-3 alpha 4 suppresses VHL-null renal cell carcinoma progression. *Cell Cycle* 6, 2810-6 (2007).
242. Tessmer, M.S. et al. KLRG1 binds cadherins and preferentially associates with SHIP-1. *Int Immunol* 19, 391-400 (2007).
243. Lang, S., Vujanovic, N.L., Wollenberg, B. & Whiteside, T.L. Absence of B7.1-CD28/CTLA-4-mediated co-stimulation in human NK cells. *Eur J Immunol* 28, 780-6 (1998).
244. Wilson, J.L. et al. NK cell triggering by the human costimulatory molecules CD80 and CD86. *J Immunol* 163, 4207-12 (1999).

## 9 Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
5-Aza-CdR	5-Aza-2'-deoxycytidin
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
CA-IX	Karbonischen Anhydrase IX
ccRCC	klarzelliges Nierenzellkarzinom
cDNA	“complementary” DNA
chRCC	chromophobes Nierenzellkarzinom
CLSM	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie
cMET	“mesenchymal epithelial transition factor”
CML	zellvermittelte Lyse
CP	Kreuzungspunkt („crossing point“)
CTA	“cancer-testis antigen“
CTLA-4	„cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4“
CXCR	Chemokin (CXC-Motiv) -Rezeptor
DC	dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5-Triphosphat
E:T	Effektor zu Target-Verhältnis
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	“epidermal growth factor”
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
FACS	“fluorescence activated cell sorting”
FFPE	Formalin-fixiert, in Paraffin-eingebettet
FGF-2	„fibroblast growth factor“
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung („gravity“)
h	Stunden
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	destilliertes Wasser
HDAC	Histon Deazetylase
HGF	“hepatocyte growth factor”
HIF	“hypoxia inducible factor”
HS	Humanserum
IFN-α	Interferon alpha
IGF	“insulin-like growth factor”
IL	Interleukin

---

IMI	Institut für Molekular Immunologie
IU	„international Units“
<i>ivt</i> RNA	“ <i>in vitro</i> transcribed RNA”
kb	Kilobasen
kDa	kilo Dalton
KLRG1	“killer cell lektin-like rezeptor G1”
LAK-Zellen	“lymphokine activated killer“-Zellen
LB	Luria Bertani
M	Molar
MaCa1	“Mamma Carcinom 1”
MDCK	“Madin-Darby canine kidney cells”
MET	mesenchymale-epitheliale Transition
MFI	mittlere Fluoreszenz-Intensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“)
min	Minuten
ml	Milliliter
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRCC	metastasierendes RCC
mRNA	„messenger“ RNA
mTOR	“mamallian target of rapamycin”
ng	Nanogramm
NKC	„normal kidney cells“
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NN	Normalniere
P	Passage
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung („phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pDNA	Plasmid DNA
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid
pRCC	papilläres Nierenzellkarzinom
qRT-PCR	„quantitative reverse transcription PCR“
RCC	“renal cell carcinoma” (Nierenzellkarzinom)
RNA	Ribonukleinsäure
RO	renales Onkozytom
RPMI	1640 Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640
RPTEC	„renal proximal tubular epithelial cells“
RT	Raumtemperatur
SIP1	“Smad-interacting protein 1”
siRNA	“small interfering RNA”
SV40	„Simian virus 40“
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TGF- $\beta$	“transforming growth factor- $\beta$ ”

---

TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TIMP	“tissue inhibitor of metalloproteinase“
UICC	“Union International Contre le Cancer“
VEGF	“vascular endothelial growth factor“
VHL	von Hippel-Lindau
VPA	Valproinsäure (“Valproic Acid“)
WT1	Wilms Tumor Suppressor-Gen 1

## 10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den vielen Menschen danken, die zu dieser Arbeit beigetragen haben und mich dabei unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. D. Schendel für die Betreuung sowie die große und immer wieder inspirierende Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit. Ihre zahlreichen Ideen und hilfreichen Kontakte eröffneten immer neue Möglichkeiten für ein bisher neues Arbeitsgebiet in der Gruppe. Ich sage auch Danke für die kritische und unermüdliche Korrektur meiner Arbeit und für die Übernahme des 2. Prüfer-Sitzes. Zuletzt möchte ich mich auch für die vielen Ausbildungs- und Förder-Möglichkeiten bedanken, die mir in dieser Zeit auf mehreren nationalen und internationalen „Meetings“, „Retreats“ und Lehrveranstaltungen ermöglicht wurden.

Ich danke Herrn Prof. W. Wurst (TUM) für die Betreuung meiner Arbeit an der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan der TUM und für die Übernahme des 1. Prüfer-Sitzes.

Als ständiger Ansprechpartner und Begleiter im Laboralltag möchte ich ganz herzlich Dr. B. Frankenberger danken. Vor allem für die vielen hilfreichen Diskussionen und die hilfsbereite Unterstützung sowie für die gründliche Korrektur meiner Arbeit.

Für die tatkräftige Unterstützung im Labor - vor allem in der Endphase meiner Arbeit - möchte ich mich bei Dr. Dominik ter Meer, Barbara Mosetter und Adam Slusarski bedanken, ohne ihr Engagement und ihre fachliche Kompetenz wären die letzten Versuche in diesem Umfang nicht möglich gewesen.

Dr. C. Hennard und Dr. Dominik ter Meer danke ich für die Unterstützung beim Western-Transfer. Dr. Dominik ter Meer danke ich zudem für die Einführung und die Unterstützung beim  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung-Versuch und bei der FACS-Analyse.

Dr. Joachim Ellwart und Karin Nispel gilt mein Dank für die Sortierung der Zellen.

Dr. Slavoljub Milosevic danke ich für alle Hilfestellungen bezüglich des Klonierens.

PD E. Nößner möchte ich für die vielen anregenden fachlichen Diskussionen danken und für die freundliche Bereitstellung eines Laborplatzes in ihrem Labor. Für das angenehme Klima und die Zusammenarbeit möchte ich mich bei ihrer ganzen Gruppe bedanken, besonders bei A. Brandel für die kompetente Unterstützung bei Zellkultur-Fragen und für die Bereitstellung von Zellen, Ainhoa-Maria Figel für die Einführung in die konfokale Mikroskopie, Petra Skrablin für die Spheroide und Petra

---

Prinz sowie Dr. Josef Mysliwietz für die Einführung in die Durchflusszytometrie und für die fachliche Hilfestellung zu sämtlichen Antikörper-Fragen.

Sylvia Donhauser möchte ich für die Übernahme alle organisatorischen und administrativen Tätigkeiten danken und für das besondere Engagement, wenn es wieder mal zeitlich sehr knapp wurde.

Ein großer Dank gilt auch unseren Kooperationspartnern, die uns die Türen zu modernen Techniken und wertvollen Materialien geöffnet haben und durch ihre fachlichen Beitrag am Erfolg des Projekts maßgeblich beteiligt sind.

Prof. H. Höfler und besonders Dr. G. Weirich von der Pathologie (TUM) möchte ich für die freundliche Bereitstellung und Befundung der Gewebepräparate danken sowie für sämtliche Hilfestellungen bei der Immunhistochemie und den Evaluationen. Zudem möchte ich Dr. G. Weirich für die unermüdlichen Bemühungen bei der Mikrodissektion danken. Karren Blechschmidt sage ich danke für die Unterstützung bei einigen Färbungen danken.

Dr. A. Buchner (LTI, LMU) möchte ich für die Ermöglichung der Mikrodissektion danken sowie für Hilfestellung dabei und für die RNA-Analyse mit dem Bioanalyser.

Für die Bereitstellung von Vektoren und Antikörpern möchte ich folgenden Personen danken: Dr. M. Ohh (Department of Laboratory Medicine and Pathology, Toronto) für den HIF3 $\alpha$ 4-Vektor, Dr. G. Berx (Flanders Interuniversity Institute of Biotechnology, V.I.B.) für den E-Cadherin-Promotor-Vektor, PD K. F. Becker (Pathologie TUM), für die fachliche Unterstützung und den E-Cadherin-Vektor und Dr. E. Kremmer (IMI) und PD E. Nößner (IMI) für die Bereitstellung von Antikörpern.

Für die schöne Zeit und die mehr als angenehme Atmosphäre im Labor 302 möchte ich mich bei Susanne, Sabine und Miran ganz herzlich bedanken (es gab oft viel zu lachen). Durch euch wurde der Laboralltag viel bunter und fröhlicher. Bei allen anderen Mitgliedern der Gruppe, die ich noch nicht erwähnt habe, möchte ich mich natürlich auch für die gute Zusammenarbeit und Hilfe bedanken sowie allen Kollegen des IMIs für die freundliche Unterstützung und bei allen „Lunch-Clubbern“ und „Mittags-Essern“ für die fachlichen und nicht-fachlichen legendären Diskussionen.

Zu guter letzt möchte ich meiner Familie und meinen Eltern danken, die mich großzügig in meiner bisherigen Laufbahn unterstützt haben und besonders meiner Freundin, die mir in der ganzen Zeit mit viel Verständnis entgegengekommen ist und für mich auch in Zeiten, in denen es suboptimal lief, immer ein Lichtblick war. Danke.