

Aus dem Labor für Tumorimmunologie, LIFE-Zentrum Großhadern

Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Ehemalige Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Zimmermann

Leitung: Prof. Dr. med. Christian Stief

**Differentielle Beeinflussung der
Tumorstammzeleigenschaften im klarzelligen
Nierenzellkarzinom durch Sulforaphan, Salinomycin,
Temsirrolimus und Everolimus**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Quynh-Trang Ngo

aus Cottbus

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Heike Pohla

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Volker Vielhauer

Prof. Dr. med. Ralph Mocikat

Mitbetreuung durch den

habilitierten Mitarbeiter: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Zimmermann

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 23. November 2017

Für meine Eltern

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Quynh-Trang Ngo, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema "Differentielle Beeinflussung der Tumorstammzeleigenschaften im klarzelligen Nierenzellkarzinom durch Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus" selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Das Nierenzellkarzinom	6
1.1.1	Epidemiologie, Risikofaktoren und Ursache	6
1.1.2	Symptome und Diagnostik	7
1.1.3	Therapiestrategien	8
1.2	Tumor-initiiierende Zellen als Ursprung von Tumoren	10
1.3	Eigenschaften von Tumorstammzellen	14
1.4	Gezielte Eradikation der Tumorstammzellen	17
1.4.1	Salinomycin	18
1.4.2	Sulforaphan	20
1.4.3	mTOR-Inhibitoren	22
1.5	Zielsetzung der Arbeit	24
2	Materialien	25
2.1	Geräte	25
2.2	Verbrauchsmaterialien	26
2.3	Chemikalien, Reagenzien und Antikörper	27
2.4	Medien und Puffer	28
2.5	Zelllinien	29
2.6	Software und Internet	29
3	Methoden	30
3.1	Methoden der Zellkultur	30
3.1.1	Einfrieren der Zellen	30
3.1.2	Auftauen der Zellen	30
3.1.3	Zellkultivierung und Zellzählung	31
3.1.4	Splitten und Passagieren der Zellen	31
3.2	<i>Drug sensitivity assay</i>	32
3.3	<i>Colony formation assay</i>	34
3.4	<i>Sphere formation assay</i>	35
3.4.1	Kultivierung und Dissoziierung von <i>spheres</i>	35
3.4.2	<i>Drug sensitivity assay</i> mit dissoziierten <i>spheres</i>	36
3.4.3	<i>Sphere formation assay</i> nach sieben-tägiger Behandlung	36
3.4.4	<i>Sphere formation assay</i> während sieben-tägiger Behandlung	37

3.5	Durchflusszytometrie	37
3.5.1	Allgemeines Prinzip	37
3.5.2	Durchführung der Durchflusszytometrie	38
3.5.3	Bestimmung der CXCR4-Expression	38
3.6	Tierversuche	39
3.6.1	Tierhaltung	39
3.6.2	Subkutane Injektion der Tumorzellen	40
3.6.3	Kontrolle des Tumorwachstums	40
3.6.4	Verabreichung der Inhibitoren	40
3.6.5	Entnahme und Einbettung der Tumoren	41
3.7	Statistik	42
4	Ergebnisse	44
4.1	Anreicherung und Quantifizierung von Tumorstammzellen durch <i>sphere formation assay</i>	44
4.2	Bestimmung der IC ₅₀ -Konzentrationen für die zytotoxische Wirkung der potentiellen Tumorstammzellinhibitoren Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus	47
4.3	Inhibition der Tumorstammzellen durch Salinomycin	52
4.4	Reduktion des Tumorstammzellanteils im RCC durch Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus	56
4.4.1	Inhibition der CXCR4 ⁺ -Zellpopulation im RCC unter Einfluss von Sulforaphan und Salinomycin	56
4.4.2	Inhibition der Ausbildung von <i>spheres</i> durch die Hemmstoffe Sulforaphan und Salinomycin	58
4.4.3	Inhibition der Ausbildung von Holoklonen unter dem Einfluss von Sulforaphan und Salinomycin	63
4.5	Reduktion des Tumolvolumens durch Sunitinib und Salinomycin	68
5	Diskussion	71
5.1	Nachweis einer Subpopulation mit Tumorstammzelleigenschaften im klarzelligen Nierenzellkarzinom	71
5.2	Sulforaphan	74
5.3	mTOR-Inhibitoren	78
5.4	Salinomycin	81
5.5	Ausblick	85

6 Zusammenfassung	87
7 Abkürzungsverzeichnis	89
8 Literaturverzeichnis	91
9 Danksagung	111

Abbildungsverzeichnis

1 Freigegebene Medikamente zur gezielten Therapie des metastasierenden RCCs	9
2 Symmetrische und asymmetrische Zellteilung	11
3 Theorien für die Heterogenität der Tumorzellen	12
4 Intratumorale Zellhierarchie und Heterogenität	13
5 Neubauer Zählkammer	32
6 Bestimmung der Zellvitalität beim <i>drug sensitivity assay</i>	34
7 Auswertung der Daten der Durchflusszytometrie	39
8 Entnahme der Tumoren aus den Mäusen	42
9 Tumorspheres	45
10 Quantifizierung von Tumorstammzellen durch <i>sphere formation assay</i> und CXCR4-Expression	46
11 Zytotoxische Wirkung von Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus auf Tumorzellen des klarzelligen Nierenzellkarzinoms	48
12 Keine toxische Wirkung von DMSO auf die Tumorzellen und keine Autofluoreszenz von Sulforaphan	49
13 Zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen des klarzelligen Nierenzellkarzinoms durch Langzeitbehandlung mit Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus	50
14 Vergleichbare zytotoxische Wirkung der Hemmstoffe auf Tumorzellen und Tumorstammzellen bei RCC-53	53
15 Selektive Inhibition von Tumorstammzellen durch Salinomycin bei SK-RC-17 .	55
16 Differentielle Beeinflussung des Gehalts an CXCR4 ⁺ -Zellen in RCC-Zelllinien durch Langzeitbehandlung mit Sulforaphan, Salinomycin, Everolimus und Temsirolimus	57

17	Differentielle Beeinflussung der Ausbildung von <i>spheres</i> in RCC-Zelllinien durch Langzeitbehandlung mit Sulforaphan, Salinomycin, Everolimus und Temsirolimus	59
18	Inhibition des <i>Spherewachstums</i> durch Sulforaphan und Salinomycin	61
19	Inhibition der Ausbildung von Zellkolonien durch Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus	64
20	Zellkolonietypen RCC-53 und SK-RC-17	65
21	Inhibition der Ausbildung der Zellkolonietypen durch Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus	66
22	Selektive Hemmung der Ausbildung von Holoklonen durch Sulforaphan und Salinomycin	67
23	Reduktion des Tumorumfanges unter Sunitinib- und Salinomycintherapie . . .	70

Tabellenverzeichnis

1	Erlangung von tumorstammzellenspezifischen Eigenschaften durch Veränderungen von intrinsischen Mechanismen	16
2	Verwendete Substanzkonzentrationen	33
3	Legende zur Kennzeichnung des Signifikanzniveaus in den Grafiken	43
4	Mittlere inhibitorische Konzentrationen IC_{50} für Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus bei verschiedenen Behandlungszeiten	51
5	Tumorstammzellen als kleine Subpopulation im Tumor	72
6	Überblick zur Wirkung der Inhibitoren auf RCC-53 und SK-RC-17	77

1 Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom

1.1.1 Epidemiologie, Risikofaktoren und Ursache

Im Jahr 2012 waren 2,4% aller malignen Erkrankungen durch das Nierenzellkarzinom (*renal cell cancer*; RCC) bedingt. Jährlich sterben 140.000 Menschen durch das RCC (Ferlay et al., 2015). Damit ist das RCC die sechzehnthäufigste Todesursache durch maligne Erkrankungen. Im Vergleich zu Afrika, Asien und Südamerika ist eine besonders hohe Inzidenz in Europa und Nordamerika zu beobachten. Eine Erklärung ist die häufige Bildgebung durch Sonografie, Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT), die zu einer früheren Diagnose des RCC führen (Znaor et al., 2015). Das RCC ist geschlechtsspezifisch, die Inzidenz ist bei Männern doppelt so hoch wie bei Frauen (Ferlay et al., 2015).

Zu den wichtigsten Risikofaktoren zur Entstehung eines RCC zählen der Nikotinkonsum (Hunt et al., 2005), Hypertension und Adipositas. Das Rauchen führt durch die chronische Gewebshypoxie und die Exposition zu Kohlenstoffmonoxid zu einer N-Nitrosamin-induzierten DNA-Schädigung im Gewebe (Chow et al., 2010). Es scheint ein Zusammenhang zwischen Adipositas und der von-Hippel-Lindau (VHL) Genveränderung zu existieren, welche die Genese von RCC begünstigt (McGuire and Fitzpatrick, 2011). Warum die Hypertonie zum RCC führt, ist noch nicht klar erfasst. Jedoch lässt eine durch die Hypertonie induzierte chronische renale Hypoxie einen Zusammenhang vermuten (Gago-Dominguez et al., 2002). Weitere Risikofaktoren sind Diabetes, chronische Nierenerkrankungen, berufliche Exposition, schlechte Ernährungsgewohnheiten sowie mangelnde körperliche Aktivität (Chow et al., 2010; Weikert and Ljungberg, 2010).

Mit 75 bis 85% ist das klarzellige Nierenzellkarzinom der häufigste Subtyp unter den RCCs, gefolgt vom papillären Subtyp mit 10 bis 15%. Seinen Namen erhält der Tumor durch den überproportional hohen zytoplasmatischen Glykogen- und Lipidanteil, was den Zellen das charakteristische Erscheinungsbild verleiht (Ljungberg et al., 2010). Das klarzellige RCC tritt sporadisch und meist unilateral auf. Die Deletion des Chromosoms 3p mit dem VHL-Gen, einem Tumorsuppressor, spielt bei der Entstehung eine entscheidende Rolle (Algaba et al., 2011). Etwa 80% der sporadischen Nierenzellkarzinome können mit der Inaktivierung des VHL-Gens in Zusammenhang gebracht werden (Cho et al., 2011).

1.1.2 Symptome und Diagnostik

Bei lediglich 30% der Patienten erfolgt die Diagnose klarzelliges RCC aufgrund von Symptomen. Die Betroffenen können sowohl unter lokalen als auch systemischen Symptomen leiden. Das häufigste lokale Symptom ist der akute oder chronische Flankenschmerz. Während die Hämaturie, palpable abdominelle Resistenzen sowie Varikozele, welche mit einer schlechten Prognose einhergehen, selten vorkommen. Es können allgemeine systemische Symptome wie Fieber, Gewichtsverlust, Nachtschweiß, Müdigkeit und Leistungsabfall auftreten. Systemische Beschwerden können nicht nur durch Metastasen, sondern auch durch paraneoplastische Symptome hervorgerufen werden. Zu den häufigsten zählen Hypertension, Anämie und Kachexie (Rini et al., 2009; Sacco et al., 2009).

Die häufige Anwendung von bildgebenden Untersuchungen im abdominellen Bereich im heutigen Zeitalter führt zu steigenden zufälligen Entdeckungen von asymptomischen renalen Raumforderungen (Capitano and Montorsi, 2015). Die meisten RCCs befinden sich im frühen Stadium, aber bis zu 17% der Patienten haben zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Fernmetastasen (Siegel et al., 2014), dennoch nimmt die Diagnose im metastasierten Zustand tendenziell ab (Rini et al., 2009). Die erste Diagnose erfolgt meist durch eine abdominelle Sonografie, welche allerdings eine geringe Spezifität aufweist (Ljungberg et al., 2010). Notwendige MRT- und CT-Untersuchungen ermöglichen eine Bestätigung der Diagnose, die genaue Charakterisierung der Raumforderung und die Beurteilung der Infiltration in umliegende Organe und Lymphknoten (Ljungberg et al., 2014). Dabei korrelieren Anreicherungen mit intravenösem Kontrastmittel in 80% der Fälle mit einer malignen Erkrankung (Prasad et al., 2008).

Eine Nierenbiopsie ermöglicht die histologische Unterscheidung zwischen benignen und malignen Tumoren, allerdings wird diese Untersuchung nicht routinemäßig durchgeführt (Lane et al., 2008). Die geringe Anwendung der renalen Biopsie ist durch Sicherheitsbedenken bedingt und übte in der Vergangenheit kaum einen Einfluss auf die Therapieentscheidung aus (Tomaszewski et al., 2014). Dennoch gewinnt sie immer mehr an Bedeutung und etabliert sich nun bei radiologisch unklaren renalen Raumforderungen. Ein Vorteil zeigt sich besonders bei Patienten, die potentielle Kandidaten für die aktive Beobachtung sind. Des Weiteren ermöglicht die Biopsie eine geeignete Therapie für Patienten mit metastatischem Nierenzellkarzinom (mRCC) zu finden. Durch moderne Biopsie-Techniken stellen Verschleppung von Tumormaterial im Stichkanal kein Problem mehr dar (Volpe et al., 2012).

1.1.3 Therapiestrategien

Trotz wissenschaftlicher Fortschritte in der Erkenntnis über das RCC, bleibt die operative Entfernung Hauptpfeiler der Therapie (Baillargeon-Gagne et al., 2010). Zur Vermeidung kurz- und mittelfristiger Komplikationen eines chirurgischen Eingriffs wurde bei geringer Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors eine abwartende Beobachtung eingeführt (Hollenbeck et al., 2006). Mit Hilfe einer vorangegangenen renalen Biopsie kann eine abwartende Beobachtung abgewägt werden. Fernmetastasen entstehen dabei mit einem Risiko von weniger als 1% (Leibovich et al., 2004; Blute et al., 2004).

Minimal invasive Techniken werden immer häufiger bei zufällig diagnostizierten kleinen Raumforderungen angewendet. Die Kryotherapie und Radiofrequenzablation waren anfangs nur für Patienten mit einer Niere oder Patienten mit vielen Risikofaktoren, welche eine Kontraindikation für größere Eingriffe darstellten, gedacht. Durch gute Ergebnisse in der Tumorkontrolle wurde die klinische Indikation erweitert (Gervais et al., 2005; Hoffmann and Bischof, 2002).

Bei der partiellen Nephrektomie wird nur der Tumor entfernt und es wird so viel Gewebe wie möglich erhalten. Der onkologische Erfolg der Nephron-erhaltenden Chirurgie ist mit der radikalen Nephrektomie vergleichbar mit dem Vorteil der Nierenteilerhaltung (Capitanio and Montorsi, 2015). Die partielle Nephrektomie ist die bevorzugte Therapie bei Tumoren im Stadium T1, die auf die Niere begrenzt sind. Sie wird besonders bei Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion oder bei bilateralem Vorkommen des Tumors angewendet. Ein laparoskopischer Eingriff ist im Vergleich zur offenen Operation mit einer geringen Morbidität verbunden, wobei Rezidive und Überleben äquivalent sind (Ljungberg et al., 2010). Das T2 Stadium erfordert eine radikale Nephrektomie durch das steigende Risiko für Rezidive (Escudier et al., 2012). Die Standardtherapie für fortgeschrittene Stadien (T3 und T4) ist eine offene radikale Nephrektomie mit der Entfernung des perinephritischen Fettgewebes, der renalen Faszie, der ipsilateralen Nebenniere sowie der umfassenden paraaortalen und paracavalen Lymphknoten (Gratzke et al., 2009; Hemal et al., 2007).

Das mRCC gehört zu den meist resistenten Malignitäten gegenüber konventioneller zytotoxischer Chemotherapie. Bisher galt die Immuntherapie mit Interleukin-2 und Interferon- α (IFN- α) lange Zeit als Hauptstütze der Therapie. Das Resultat war jedoch ernüchternd, denn das 5-Jahresüberleben betrug lediglich 6% (Bellmunt et al., 2014; Mattei et al., 2014). Die Erforschung von neuen biologischen Signalwegen und die Anwendung von zielgerichteten

Therapien verbessern deutlich das Überleben der Patienten im metastasierten Stadium. Bei diesen Therapiezielen handelt es sich vorrangig um *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR), *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) und *mammalian target of rapamycin* (mTOR) pathway. Sieben Medikamente wurden durch die europäische Arzneimittel-Agentur und die amerikanische *Food and Drug Administration* (FDA) genehmigt (Capitiano and Montorsi, 2015) (siehe Abbildung 1).

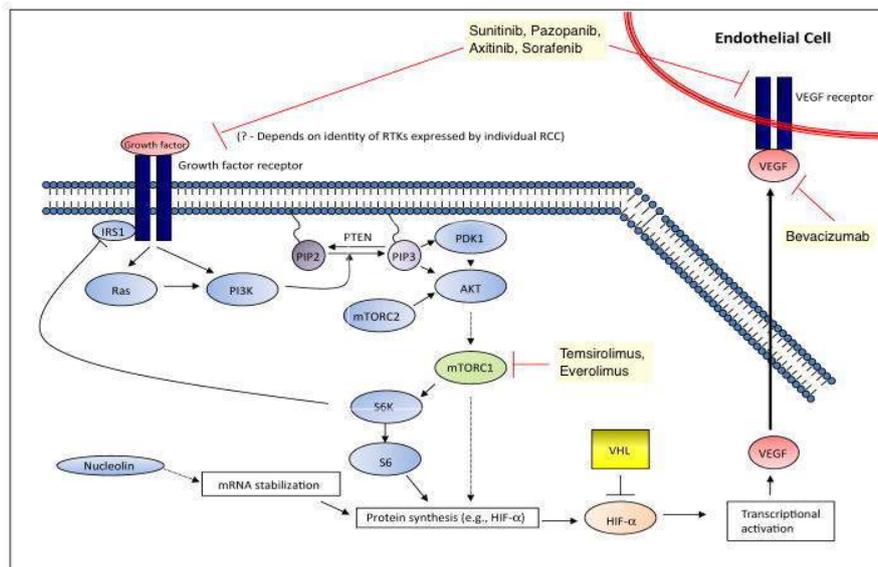


Abbildung 1: **Freigegebene Medikamente zur gezielten Therapie des metastasierenden RCCs.** Sunitinib, Pazopanib, Axitinib und Sorafenib führen zu einer Inhibition des VEGF-Rezeptors und des PDGF-Rezeptors. Bei Bevacizumab handelt es sich um einen humanisierten monoklonalen Antikörper gegen VEGF. Temsirolimus und Everolimus sind Inhibitoren von mTOR (Hudes et al., 2011).

Sunitinib, ein Medikament der ersten Wahl bei mRCC, ist ein oral verabreichter Tyrosinkinase-Rezeptor-Inhibitor (TKI) mit multiplen Zielen inklusive VEGFR, PDGFR und Stammzellfaktor-Rezeptor (c-Kit) (Hutson, 2011). Klinisch konnte eine signifikante Steigerung im progressionsfreien Überleben durch die Behandlung mit Sunitinib im Vergleich zu IFN- α beobachtet werden (Motzer et al., 2007). Bevacizumab ist ein rekombinanter humanisierter monoklonaler Antikörper, der direkt VEGF inhibiert. Eine klinische Phase II Studie ergab eine signifikante Verlängerung der Zeit bis zur Progression der Erkrankung unter einer Hochdosis-Bevacizumab-Therapie (Yang et al., 2003). Wie Sunitinib ist Pazopanib ein oraler, hochselektiver TKI gegen VEGFR, PDGFR und c-Kit. In einer internationalen, multizentrischen Phase III Studie konnte die effektive Wirkung von Pazopanib in der Steigerung des progressionsfreien Überlebens bei therapieresistenten Patienten im Vergleich zum Placebo gezeigt

werden (Sternberg et al., 2010). Axitinib und Sorafenib gelten als Mittel der zweiten Wahl zur Behandlung von Patienten mit mRCC bei Therapieversagen der TKI und Bevacizumab. Seit einigen Jahren kommen Temsirolimus und Everolimus ebenfalls in der Behandlung von mRCC zum Einsatz. Sie zeigten bereits in Phase III Studien einen verlängernden Effekt auf das progressionsfreie sowie das Gesamtüberleben (Hutson, 2011). Bei Hochrisikopatienten erwies sich Temsirolimus wirksamer als die Monotherapie mit IFN- α (Hudes et al., 2007). Everolimus zeigt einen signifikanten Vorteil im progressionsfreien Überleben im Vergleich zum Placebo beim mRCC nach Therapieversagen von Sunitinib und Sorafenib (Motzer et al., 2008).

Trotz Verbesserungen der Therapiestrategien auf molekularer Ebene bleibt die Prognose des mRCCs mangelhaft. Nach Therapiestart beträgt das mediane Überleben lediglich 18,5 Monate (Schutz et al., 2014). Das RCC ist mit einer hohen Metastasenrate zum Diagnosezeitpunkt und einer hohen Rezidivrate aufgrund von Resistenzen gegen Chemotherapeutika und Strahlentherapie verbunden. Die frühe Erkennung des RCCs und der therapeutische Einsatz von TKI und mTOR-Inhibitoren konnten die Prognose nur geringfügig verbessern. Der Verlauf des RCC ist kaum vorhersagbar und die Prognose bleibt schlecht (Coppin et al., 2011). Für diese Therapieresistenz und diese hohe Rezidivrate sind Tumor-initiiierende Zellen, auch Tumorstammzellen (*cancer stem cells*; CSC) genannt, verantwortlich (Reya et al., 2001). Sie spielen möglicherweise eine entscheidende Rolle in der Pathogenese und Prognose dieser Tumoren. Durch die Varianz der CSC in verschiedenen Tumorentitäten konzentrierten sich bisher nur wenige Studien auf die Identifikation von renalen CSC (Bussolati et al., 2013).

1.2 Tumor-initiiierende Zellen als Ursprung von Tumoren

Die physiologische Funktion von Stammzellen ist die Aufrechterhaltung der Homöostase von Geweben durch Selbsterneuerung und Ausbildung von differenzierten Zellen. Dies geschieht durch asymmetrische und symmetrische Teilung der Stammzellen (Barker et al., 2010) (siehe Abbildung 2). Zur Erhaltung der Gewebshomöostase ist nur eine asymmetrische Zelldivision erforderlich, die Anzahl der Stammzellen im Gewebe bleibt konstant. Bei Organwachstum und Wundheilung hingegen kommt es zu einer asymmetrischen und symmetrischen Zellteilung. Beim Tumorwachstum ist dies ebenfalls der Fall. Durch die symmetrische Zellteilung steigt die Gesamtzahl der Stammzellen (Boman et al., 2007). Durch ihre Langlebigkeit sind Stammzellen ein Angriffspunkt für Mutationen und stellen damit als

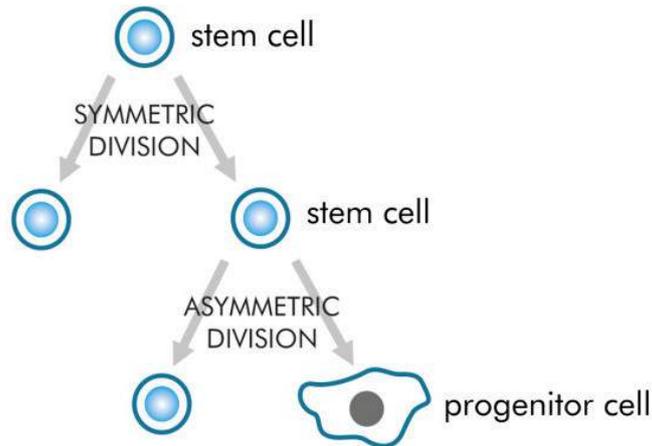


Abbildung 2: **Symmetrische und asymmetrische Zellteilung.** Man unterscheidet zwei Varianten der Zellteilung. Bei der symmetrischen Teilung entstehen aus einer Stammzelle zwei identische Tochterzellen, die ebenfalls Stammzeleigenschaften besitzen. Durch die asymmetrische Teilung entstehen aus einer Stammzelle eine Tochterstammzelle sowie eine differenzierte Tochterzelle (Fulawka et al., 2014).

CSC den Ursprung für Tumoren dar. Heutzutage wird die wichtige Rolle von CSC bei der Karzinogenese sowie bei der Aufrechterhaltung von Tumoren weitgehend anerkannt (Clarke et al., 2006). Der erste Nachweis von CSC erfolgte 1997 bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) (Bonnet and Dick, 1997). Sechs Jahre später wurden erstmals CSC in einem soliden Tumor, dem Mammakarzinom, nachgewiesen (Dontu et al., 2003b).

Der Nachweis von CSC erfolgte in weiteren verschiedenen malignen Tumoren des Menschen, wie dem Glioblastom (Bao et al., 2006), Ovarialkarzinom (Gao et al., 2010), hepatozellulärem Karzinom (Sell, 1993), Kolonkarzinom (Todaro et al., 2007) sowie dem Nierenzellkarzinom (Bussolati et al., 2008), die mit einem hohen Rezidivrisiko verbunden sind. Dies hat zu der Hypothese geführt, dass sich Tumorzellen ebenso wie das physiologisch proliferative Gewebe hierarchisch organisieren und sich durch eine begrenzte Anzahl an Stammzellen vermehren (Bonnet and Dick, 1997).

Tumorzellen zeigen sowohl eine intra- als auch eine intertumorale Heterogenität. Sie exprimieren unterschiedliche Oberflächenmarker (Fidler and Hart, 1982; Fidler and Kripke, 1977; Nowell, 1976). Tumorzellen weisen einen Unterschied im Phänotyp und im Tumorverhalten auf (Marusyk and Polyak, 2010). Für den Ursprung der Heterogenität gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Durch zufällige genetische (Nowell, 1976) und epigenetische (Baylin and Jones, 2011) Mutationen wird eine klonale Evolution herbeigeführt (siehe Abbildung 4). Vorteilhafte Phänotypen gewähren bestimmten Tumorzellen innerhalb eines Tumors einen

Selektionsvorteil. Eine weitere Theorie besagt, dass Tumorzellen durch die Mikroumgebung des Tumors beeinflusst werden, was zur weiteren Heterogenität innerhalb des Tumors beiträgt (Charles and Holland, 2010). Das Tumorstammzellmodell umfasst die Vorstellung, dass intratumoral verschiedene Tumorzellpopulationen existieren. Die CSC stellen dabei eine kleine Population da, die durch symmetrische und asymmetrische Zellteilung zur Aufrechterhaltung und zum Wachstum des Tumors führen (Reya et al., 2001). Schließlich stellt die Fusion aus den bisher genannten Modellen die vierte Theorie dar, in der alle Modelle koexistieren, da sie sich nicht gegenseitig ausschließen müssen (Magee et al., 2012) (siehe Abbildung 3).

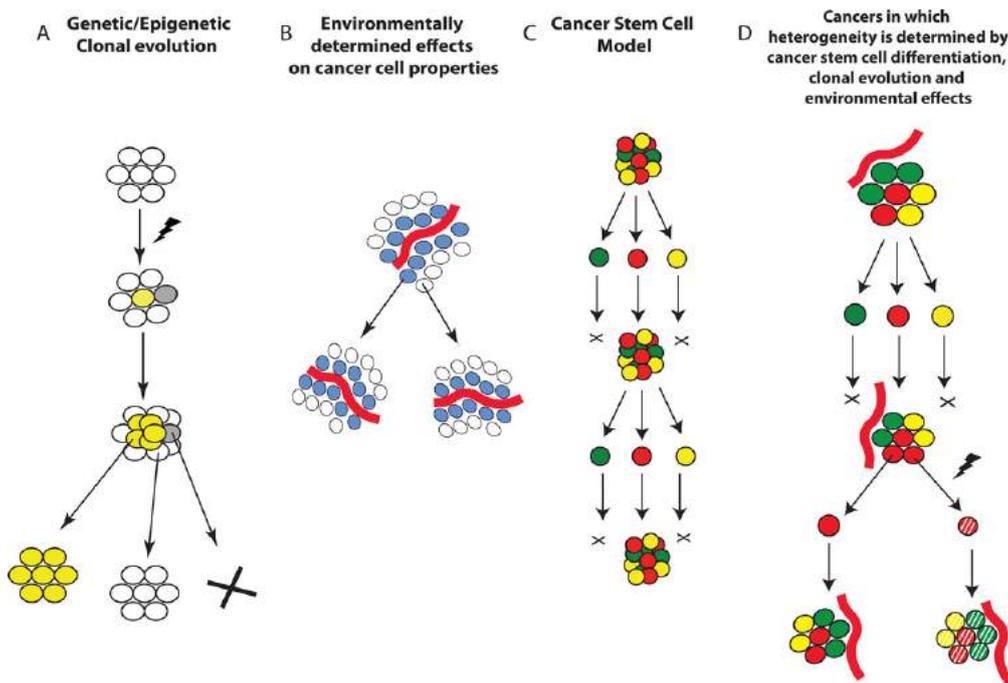


Abbildung 3: Theorien für die Heterogenität der Tumorzellen. Innerhalb eines zunächst homogenen Tumors (weiß) können durch genetische und epigenetische Mutationen (gelb, grau) Zellen mit unterschiedlichen Eigenschaften entstehen. Tumorzellen mit einem Selektionsvorteil (weiß, gelb) sind in der Lage Klone auszubilden, während Zellen mit nachteiligen Genen (grau) zu Grunde gehen (A). Tumorzellen mit direkter oder indirekter Nähe zu Blutgefäßen (blau) entwickeln durch die Mikroumgebung andere Eigenschaften als weiter entfernte Zellen (weiß) (B). Das Tumorstammzellmodell beschreibt die Existenz einer kleinen Subpopulation mit Stammzeleigenschaften innerhalb eines Tumors (rot), welche in der Lage sind Klone auszubilden. Ausdifferenzierte Zellen (grün, gelb) besitzen nicht die Fähigkeit neue Tumoren zu generieren (C). Das letzte Modell vereint alle Theorien: die klonale Evolution, der Einfluss der Mikroumgebung auf die Tumorzelleigenschaften sowie das Tumorstammzellmodell. Diese Theorien können koexistieren, da sie sich nicht gegenseitig ausschließen (D) (Magee et al., 2012).

Wie Sell schon im Jahre 1993 beschrieb: "Wenn man vom fundamentalen Prinzip ausgeht, dass Tumoren aus einer Zelle entstehen, welche die Fähigkeit besitzt sich zu teilen, gibt es

zwei Hypothesen für den Ursprung eines Tumors. Sie entwickelt sich aus einer Stammzelle oder aus einer dedifferenzierten Zelle, welche die Fähigkeit zur Selbsterneuerung wiedererlangt hat" (Sell, 1993). Es ist also prinzipiell möglich, dass sich die Ursprungszelle eines Tumors aus verschiedenen Zellen in der Hierarchie, wie einer somatischen Stammzelle, einer Progenitorzelle oder einer ausdifferenzierten Zelle, durch Reaktivierung der selbsterneuernden Eigenschaften entsteht (Merlos-Suarez et al., 2011; Barker et al., 2009). Sowohl die gewebespezifischen Stammzellen als auch die CSC stellen nur eine kleine Fraktion im Gewebe bzw. im Tumor dar. Durch die Kombination asymmetrischer und symmetrischer Zellteilung kann ihre Anzahl erhalten werden (Boman et al., 2007).

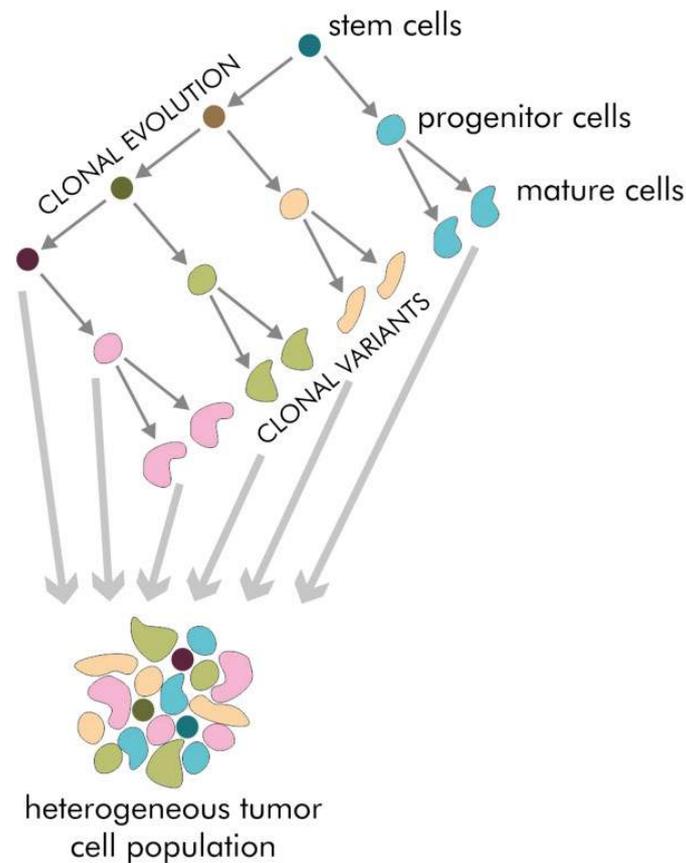


Abbildung 4: **Intratumorale Zellhierarchie und Heterogenität.** Es wird zum einen die Zellhierarchie innerhalb eines Tumors dargestellt, der aus Stammzellen, Progenitorzellen sowie ausdifferenzierten, reifen Zellen besteht. Zum anderen ist die Heterogenität in einem Tumor durch die klonale Evolution und die Tumorzellhierarchie zu sehen. Durch genetische Mutationen und epigenetische Modifikationen entstehen multiple Klone mit unterschiedlichen Eigenschaften und Verhaltensweisen (Fulawka et al., 2014).

1.3 Eigenschaften von Tumorstammzellen

Nach einer Konsensusdefinition besitzen CSC die Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie zur Differenzierung und schaffen einen Tumor, der aus heterogenen Linien von Tumorzellen besteht (siehe Abbildung 4). CSC sind nicht nur für die Initiierung und Aufrechterhaltung von Karzinomen verantwortlich, sondern auch für die Entstehung von Rezidiven und Metastasen. CSC können experimentell durch ihre Eigenschaft zur Generierung von neuen Tumoren definiert werden. Selbst nach mehreren Xenotransplantationen sind die Zellen in der Lage, kontinuierlich wachsende Tumoren zu generieren (Clarke et al., 2006; Jordan, 2006).

Durch das Fehlen von spezifischen, ubiquitär auf allen CSC vorkommenden Oberflächenmarkern ist die sichere Identifizierung von CSC schwierig. Jedoch können mit Hilfe von potentiellen Oberflächenmarkern CSC isoliert werden und in immundefiziente Mäuse transplantiert werden. Die Tumorgenerierung und das Tumorstadium sprechen für das Vorhandensein von CSC (Khan et al., 2015; Al-Hajj et al., 2003). Die erste Isolierung von CSC gelang mit einer $CD44^+/CD24^-$ -Subpopulation im Mammakarzinom. Die Transplantation von nur 100 Zellen der $CD44^+/CD24^-$ -Subpopulation in *Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency*-Mäuse (NOD/SCID-Mäuse) führte zur Generierung eines neuen Tumors, 10.000 Zellen anderer Subpopulationen waren hingegen nicht in der Lage einen neuen Primärtumor zu bilden (Gupta et al., 2009; Sheridan et al., 2006).

Als Tumorstammzelloberflächenmarker im RCC wurden CD105, CD133, CD44 sowie CXCR4 identifiziert. Neben Oberflächenmarkern können CSC ebenfalls durch erhöhte Enzymaktivität identifiziert werden. Eine erhöhte Aktivität der Aldehyd-Dehydrogenase-1 (ALDH1) in normalen Zellen sowie in Tumorzellen sind mit Stammzeleigenschaften assoziiert (Ginestier et al., 2007).

CD105 ist ein Oberflächenmarker für mesenchymale Stammzellen, die die Fähigkeit zur Differenzierung in Endothel- und Epithelzellen besitzen. Diese Eigenschaft spielt eine wichtige Rolle in der Angiogenese (Duff et al., 2003). Zellen mit der Expression von CD105 repräsentieren in RCC weniger als 10% der Tumormasse. Diese Zellen zeigen Tumorstammzell-eigenschaften und sind in der Lage, nach Xenotransplantationen neue Karzinome zu generieren. Die seriell transplantierten Karzinome beinhalten wiederum eine kleine Population undifferenzierter $CD105^+$ -Zellen und eine große Population differenzierter $CD105^-$ -Tumorepithelzellen (Bussolati et al., 2008). Die $CD105^+$ -Population zeigt typische

Stammzeleigenschaften, wie die Expression von Nestin, NANOG und OCT4, die Fähigkeit zur Ausbildung von *spheres* unter nicht-adhärenenten Wachstumsbedingungen und zur Differenzierung in epitheliale und endotheliale Zellen *in vitro* (Bussolati et al., 2008). Der Oberflächenmarker CD133 spielt eine wichtige Rolle zur Beschreibung von hämatopoetischen Stammzellen (Li, 2013). Auch wurden CD133⁺-Zellen als renale Progenitorzellen identifiziert und tragen zur Tumorvaskularisierung und Angiogenese bei (Bruno et al., 2006). Das Oberflächenantigen CD44 steht mit vielen physiologischen Prozessen, wie Wundheilung, Differenzierung, Zellwachstum und Zellüberleben, aber auch mit Tumorzellmigration, -invasion und Metastasierung in Verbindung (Hiraga et al., 2013; Visvader and Lindeman, 2008).

Der CXC-Motiv-Chemokinrezeptor-4 (CXCR4, *cluster of differentiation* CD184) gehört zu der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und gilt als prognostischer Marker in verschiedenen Tumoren. Das CXC-Motiv-Chemokin-12 (CXCL12) fungiert als Ligand zum CXCR4. Dieser Komplex spielt eine zentrale Rolle in Signalwegen von Stammzellen (Lapidot and Kollet, 2002). Es wurden CXCR4 exprimierende CSC in verschiedenen Tumoren gefunden, wie in Lymphknoten, Leber, Lunge und Knochen (Kucia et al., 2005; Mukherjee and Zhao, 2013). Gassenmaier et al. identifizierten im klarzelligem Nierenzellkarzinom eine CXCR4⁺-Subpopulation. Die sortierten CXCR4⁺-Zellen weisen eine hohe Expression von Stammzellgenen, wie NANOG, POU5F1, SOX-2, sowie eine höhere Resistenz gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren auf (Gassenmaier et al., 2013). Pan et al. stellten die Hypothese auf, dass die biologische Achse von CXCL12 über die Interaktion mit dem Rezeptor CXCR4 einen zentralen Mechanismus in der Metastasierung von RCC spielen. Die CXCR4-Expression im humanen RCC korreliert direkt mit ihrer Fähigkeit, Metastasen in NOD/SCID-Mäusen auszubilden. Durch eine Neutralisierung der CXCL12 in SCID-Mäusen konnte die Metastasierungstendenz reduziert werden (Pan et al., 2006).

Die Identifikation von CSC durch Oberflächenmarker und Enzymaktivität ist jedoch durch die Heterogenität der Tumoren stark eingeschränkt. Der *sphere formation assay* stellt eine Marker-unabhängige Methode dar, um CSC in Tumoren zu identifizieren und zu kultivieren (Chen et al., 2016). Normale differenzierte Zellen eines soliden Organs besitzen adhärenente Eigenschaften. Die Anheftung an eine extrazelluläre Matrix ist essentiell für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase. Störungen dieser Zellzusammenschlüsse führen zu einem programmierten Zelltod, Anoikis (Mehlen and Puisieux, 2006). Stammzellen besitzen die Fähigkeit unter nicht-adhärenenten Bedingungen zu überleben. Während der Großteil der Tumorzellen zu Grunde geht, sind CSC in der Lage anoikisresistente *spheres* zu bilden

(Dontu et al., 2003a). Beispielsweise zeigen *spheres* der Nierenzellkarzinomzelllinie SK-RC-42 stammzelltypische Eigenschaften wie Selbsterneuerung *in vitro* und *in vivo*, höhere mRNA-Expression von Stammzellgenen, höhere Tumorigenität und Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapien (Zhong et al., 2010).

Eigenschaft der CSC	intrinsischer Mechanismus
Deregulierte Proliferation und Differenzierung <ul style="list-style-type: none"> • Fähigkeit zur Selbsterneuerung • unkontrollierte Zellteilung 	Aktivierung von embryonalen Signalwegen <ul style="list-style-type: none"> • Notch (Takebe et al., 2011) • Wnt/β-Catenin und Hedgehog (Takebe et al., 2011) • Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-vermittelten Signalweges (Martelli et al., 2011)
Resistenz gegen Chemotherapeutika <ul style="list-style-type: none"> • aktiver Transport der Chemotherapeutika aus der Tumorzelle • Aktivierung von Überlebenssignalwegen 	<ul style="list-style-type: none"> • Expression von <i>ATP-binding cassette</i> (ABC) Transporter (Dean, 2009) • Expression und Aktivierung der AKT/PKB Signalwege (Ma et al., 2008)
Resistenz gegen Radiotherapie <ul style="list-style-type: none"> • effiziente DNA-Reparatur • verstärkte <i>checkpoint</i> Aktivierung 	<ul style="list-style-type: none"> • Expression von CD133 (Prominin-1) (Bao et al., 2006)
Apoptoseresistenz	autokrine Produktion von Interleukin-4 (Todaro et al., 2007)
Inaktivierung von Tumorsuppressoren	Verlust der Phosphatase PTEN (<i>phosphatase and tensin homolog</i>) (Stiles et al., 2004)
Expression von Tumorstammzellmarkern	vermehrte Aktivität der Aldehyd Dehydrogenase 1 (ALDH1) (Ginestier et al., 2007)
Tumorigenese	konstitutive Aktivierung des NF- κ B (Liu et al., 2010)

Tabelle 1: Erlangung von tumorstammzellspezifischen Eigenschaften durch Veränderungen von intrinsischen Mechanismen (modifiziert nach Capitanio and Montorsi, 2015).

Genetische Mutationen und epigenetische Modifikationen führen zu Veränderungen in der Proteinexpression. Die damit verbundene Aktivierung oder Inhibition von intrinsischen Mechanismen innerhalb der Tumorzelle führen zu den typischen Eigenschaften einer CSC. Die Aktivierung von embryologischen Signalwegen, wie Wnt/ β -Catenin, Hedgehog und NOTCH,

führen zur Fähigkeit der Selbsterneuerung und zur unkontrollierten Zellteilung (Takebe et al., 2011) (siehe Tabelle 1). Der Erwerb der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) führt zur Dedifferenzierung von Tumorzellen und damit zur Erlangung von CSC-Eigenschaften (Creighton et al., 2009; Mani et al., 2008).

Kürzliche Studien zeigen Hinweise für die Relevanz von CSC in klinischen Therapiestrategien (Tehranchi et al., 2010; Creighton et al., 2009). CSC besitzen zahlreiche intrinsische Mechanismen zur Resistenz gegenüber konventionellen Chemotherapeutika und der Strahlentherapie (siehe Tabelle 1). Durch die Expression von *ATP-binding cassette* (ABC) Transportern erfolgt der aktive Transport von Chemotherapeutika aus der Tumorzelle (Dean, 2009). Die geringe proliferative Aktivität (Gao et al., 2010) und der transiente oder langfristige Ruhezustand stellen einen schwachen Angriffspunkt für Strahlen- und Chemotherapie dar (Essers and Trumpp, 2010). Diese Resistenz führt bei Strahlen- und Chemotherapien zur Anreicherung von Tumorstammzellen. Beim fortgeschrittenen Mammakarzinom konnte beobachtet werden, dass konventionelle Therapeutika lediglich zu einer Verkleinerung der Tumormasse und damit zu einer Steigerung des CSC-Anteils führen (Li et al., 2008b). Dieses Phänomen lässt sich bei der chronischen myeloischen Leukämie unter Therapie mit Imatinib ebenfalls beobachten (Goldman, 2010).

Weitere wichtige Mechanismen zum Überleben der Tumorzellen sind die Apoptoseresistenz, u.a. durch die Produktion von Interleukin-4 bedingt (Todaro et al., 2007), der Schutz der Tumorzellen durch Mikroumgebungen und Nischen (Korkaya et al., 2011; Calabrese et al., 2007), metabolische Veränderungen mit Präferenz zur Hypoxie (Zhou et al., 2011) und Immunevasion (Reim et al., 2009). Viele dieser CSC-spezifischen Mechanismen sowie bisher unbekannte Mechanismen der Immortalität und Resistenz (Maugeri-Sacca et al., 2011; Morrison et al., 2011) ermöglichen das Überleben von CSC gegenüber aktuellen Therapien und initiieren die Rekonstitution des Tumors, langfristige Rezidive und Metastasen (Tehranchi et al., 2010; Creighton et al., 2009).

1.4 Gezielte Eradikation der Tumorstammzellen

Aktuelle Tumorthérapien sind meist gegen differenzierte Tumorzellen gerichtet. CSC gewinnen aber zunehmend an Bedeutung, da sie Resistenzen gegenüber konventionellen Chemo- und Radiotherapien vermitteln (Khan et al., 2015). Daher repräsentieren CSC einen neuen relevanten Angriffspunkt für Tumorthérapien. Identifizierung, Entwicklung und der

therapeutische Einsatz von Wirkstoffen, die selektiv CSC angreifen, sind bedeutsame Herausforderungen für die Zukunft der Tumortherapie (Morrison et al., 2011). Als Ziel der CSC-Therapie sollte die Eradikation aller CSC im Patienten angestrebt werden. Die CSC repräsentieren eine heterogene Population, welche möglicherweise nicht homogen sensitiv gegenüber einem bestimmten Anti-CSC-Wirkstoff sind (Magee et al., 2012; Lorico and Rappa, 2011) und erfordern Kombinationstherapien zur Eradikation des gesamten Tumors.

Verschiedene Wirkstoffe und Medikamente mit dem spezifischen Therapieziel CSC wurden bereits entdeckt (Prud'homme, 2012). Bei diesen Substanzen handelt es sich um aus Mikroorganismen und Pflanzen stammende Verbindungen (Naujokat and Steinhart, 2012; Kawasaki et al., 2008), Inhibitoren von Schlüsselenzymen in intrinsischen Signalwegen der CSC (Ginestier et al., 2010), gegen CSC-Oberflächenmoleküle gerichtete Antikörper (Okamoto and Perez, 2008), aber auch um klassische Medikamente wie Metformin (Hirsch et al., 2009), Tranilast (Prud'homme et al., 2010) und Thioridazine (Sachlos et al., 2012), welche seit Jahrzehnten für metabolische, allergische und psychotische Erkrankungen eingesetzt werden. Im folgenden wird näher auf die Herkunft und Eigenschaften der Inhibitoren Salinomycin, Sulforaphan, Temsirolimus und Everolimus eingegangen.

1.4.1 Salinomycin

1974 wurde Salinomycin in Japan als neues Antibiotikum entdeckt. Es wurde aus dem Bakterium *Streptomyces albus* isoliert. Salinomycin zeigt eine antimikrobiologische Wirkung gegen Gram-positive Bakterien, wie *Staphylococcus aureus* und *Bacillus subtilis* (Miyazaki et al., 1974).

Gupta et al. überprüften 16.000 chemische Stoffe auf ihre selektive Wirkung gegenüber CSC. Unter 32 vielversprechenden Agenzien zeigte lediglich Salinomycin eine signifikante Inhibition der chemoresistenten CD44⁺-CD24⁻-CSC-Population. Salinomycin inhibierte CSC im Mammakarzinom 100-fach effektiver als Paclitaxel, dem konventionellen Chemotherapeutikum für Mammakarzinome. Des Weiteren hemmt Salinomycin die Tumorentstehung in immundefizienten Mäusen. Menschliche Tumorzellen wurden *in vitro* mit Salinomycin für sieben Tage vorbehandelt. Nach Injektion in NOD/SCID-Mäuse zeigen mit Salinomycin behandelte Tumorzellen eine 100-fach reduzierte Fähigkeit zur Tumorgenerierung im Vergleich zu den mit Paclitaxel behandelten Zellen. Die Behandlung der xenotransplantierten Mäuse mit Salinomycin, zeigt eine Reduktion der Tumormasse und der Metastasen. Explantierte

Tumore zeigen einen geringeren Anteil an CSC und eine erhöhte epitheliale Differenzierung (Gupta et al., 2009). Ähnliche Ergebnisse konnten Gong et al. bei CSC des Mammakarzinoms zeigen: Salinomycin reduzierte die Fähigkeit zur Ausbildung von *spheres* und hemmte die Expression des Tumorstammzellmarkers ALDH1 um das 50-fache (Gong et al., 2010).

Salinomycin induziert Apoptose in verschiedenen Tumoren und greift dabei sowohl differenzierte Tumorzellen, multipel-resistente Tumorzellen, als auch CSC an (Fuchs et al., 2009). Salinomycin überwindet bei der AML das Problem der ABC-Transporter-assoziierten Multi-therapieresistenz und Apoptoseresistenz in CSC durch Reduktion der Expression von funktionellen ABC-Transportern, welche für die Resistenz gegenüber zahlreichen Chemotherapeutika verantwortlich sind. Zu denen gehören u.a. Doxorubicin, Gemcitabin, 5-Fluorouracil, Bortezomib, jedoch nicht Salinomycin. Die Folge ist eine massive Apoptose der leukämischen CSC. Während Salinomycin die Langzeitadaptation von AML-Tumorzellen verhindert, führen Behandlungen mit Doxorubicin und Bortezomib zur Ausbildung von Resistenzen bei zuvor apoptotisch wirkenden Konzentrationen (Fuchs et al., 2010).

Im Gastrointestinalen Stromalen Tumor (GIST) wurde eine CD44⁺-CD34⁺-Kit⁻-Subpopulation mit selbsterneuenden und Tumor-initiiierenden Eigenschaften identifiziert. Diese Tumorzellpopulation zeigt Resistenz gegenüber Imatinib, einem bei metastatischen GIST verwendeten TKI. Im Vergleich dazu hemmt Salinomycin fast die komplette Proliferation der CD44⁺-CD34⁺-Kit⁻-Subpopulation und fördert die Zelldifferenzierung. Allerdings zeigt die Kombinationstherapie von Salinomycin und Imatinib *in vitro* eine signifikant höhere Proliferationsinhibition als Salinomycin allein und stellt damit eine neue, vorteilhaftere Therapie-strategie für Patienten dar (Naujokat and Steinhart, 2012; Bardsley et al., 2010).

Neben der bereits beschriebenen Apoptoseinduktion (Fuchs et al., 2009) und der Interaktion mit ABC-Transportern (Fuchs et al., 2010) ist Salinomycin in der Lage, CSC auch auf anderen Wegen zu inhibieren. Salinomycin führt zur Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs (Lu et al., 2011), welcher für die Aufrechterhaltung der CSC-spezifischen Eigenschaften essentiell ist. Weiterhin hemmt Salinomycin die oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien (Mitani et al., 1976), welche bei maligner Transformation von mesenchymalen Stammzellen erhöht ist. Durch diesen metabolischen Weg kann der gesteigerte Energiebedarf in Tumorzellen gedeckt werden (Funes et al., 2007). Salinomycin ist ein Kaliumionophor und beeinflusst durch den Kaliumionenfluss aus Mitochondrien in das Zytoplasma das transmembrane Kaliumionenpotential (Mitani et al., 1976, 1975). Eine erhöhte Expression von Kaliumionenkanälen zeigt sich in CD34⁺-CD38⁻-AML-CSC (Li et al., 2008a) und in CD133⁺-Neuroblastom-

CSC (Park et al., 2010) und lässt eine Korrelation zwischen Kaliumionenkonzentrationen und CSC vermuten. Salinomycin führt vermutlich durch seinen Einfluss auf den Kaliumionenfluss zur Apoptose in CSC (Andersson et al., 2006). Schließlich ist Salinomycin in der Lage, die Differenzierung von CSC zu fördern, indem die Expression von Genen, welche in der epithelialen Differenzierung von Mammagewebe involviert sind, hochreguliert werden (Gupta et al., 2009).

2010 fand Salinomycin erste Anwendung am Menschen. Salinomycin wurde über drei Wochen jeden zweiten Tag intravenös verabreicht. Das Ergebnis dieser Behandlung war eine partielle Tumorregression der Metastasen verbunden mit nur geringen akuten und Langzeit-Nebenwirkungen (Naujokat and Steinhart, 2012). Salinomycin lieferte bereits vielversprechende Ergebnisse in der Reduktion des CSC-Anteils im Mammakarzinom, AML und Magenkarzinom. Weitere Publikationen zeigen ebenfalls eine erfolgreiche CSC-Inhibition im Adenokarzinom der Lunge (Wang, 2011), Osteosarkom (Tang et al., 2011), kolorektalen Karzinom (Dong et al., 2011), Plattenepithelkarzinom (Basu et al., 2011) und Prostatakarzinom (Ketola et al., 2012), jedoch liegen bisher keine Untersuchungen zu Wirkungen von Salinomycin auf das RCC vor.

1.4.2 Sulforaphan

Sulforaphan ist ein natürlicher Bestandteil von Kreuzblütengewächsen, wie zum Beispiel Brokkoli, Blumenkohl oder Rettich (Guerrero-Beltran et al., 2012), und gilt als potentes Chemopräventivum gegenüber Karzinomen (Weisburger, 1999). Seine gesundheitsfördernden Eigenschaften können zum einen der antioxidanten Wirkung zugesprochen werden (Zanichelli et al., 2012), zum anderen verhindert Sulforaphan epigenetische Veränderungen und damit die Entstehung von Tumoren. Abnormale Veränderungen in der Gentranskription können durch Sulforaphan wieder rückgängig gemacht werden (Tortorella et al., 2015). Aufgrund seines hohen Gehalts an Glukosinolat wird Sulforaphan als sehr gesund betrachtet (Abdull Razis et al., 2011). Durch Hydrolyse von Glukosinolat und Glukoraphanin durch das Enzym Myrosinase entsteht Sulforaphan. Im Nahrungsmittel ist nur das R-Isomer des Sulforaphans vorhanden, während das S-Isomer nur durch chemische Synthese gewonnen werden kann. Das R-Isomer zeigt im Vergleich zum S-Isomer eine deutliche Überlegenheit in der chemopräventiven Wirkung (Abdull Razis et al., 2011) .

Im malignen Melanom wurde eine Subpopulation mit stammzelltypischen Eigenschaften,

wie erhöhter Expression von Stammzellmarkern, gesteigerte Überlebensfähigkeit durch Ausbildung von *spheres* und verstärkte Zellmigration und -invasion, gefunden. Durch eine Sulforaphanbehandlung wurde das Zellüberleben durch eine Herunterregulierung des *Enhancer of zeste homolog 2* (*Ezh2*) unterdrückt (Fisher et al., 2015).

Eine Dysregulation im Sonic-Hedgehog-Signalweg wird mit Tumorstammzellen assoziiert und ist verantwortlich für die Entstehung des Pankreaskarzinoms. Dieser aggressive Tumor geht mit einer hohen Letalität einher und stellt noch immer eine große Herausforderung für die Medizin dar. Sulforaphan führt zu einer Inhibition des Sonic-Hedgehog-Signalweges, hemmt dadurch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung (Rodova et al., 2012), und induziert effektiv die Apoptose von CSC im Pankreaskarzinom durch Interaktion mit NF- κ B, einem anti-apoptotischen Signalweg (Kallifatidis et al., 2009). Die anti-CSC Eigenschaften gegen das duktales Adenokarzinom des Pankreas durch Sulforaphan zeigen sich auch durch eine Inhibition der Tumorprogression, eine Reduktion der Ausbildung von *spheres* und Zellkolonien sowie durch eine Erhöhung von miR-let-7, und fördert damit die terminale Differenzierung in der Entwicklung und die Tumorsuppression (Appari et al., 2014). Sulforaphan inhibiert in Mammakarzinomzellen ebenfalls einen Selbsterneuerungssignalweg, den Wnt/ β -Catenin-Signalweg, durch die Induktion der β -Catenin-Phosphorylierung (Kallifatidis et al., 2009). Verschiedene Signalwege, welche das Zellwachstum und die Zellproliferation stimulieren, werden durch Sulforaphan gehemmt. Dazu zählen der Hypoxie-induzierte Faktor-1 α (HIF-1 α) sowie *Insulin-like growth factor receptor-1* (Feitelson et al., 2015).

Sulforaphan zeigt nicht nur eine effektive Bekämpfung der CSC *in vitro*, sondern auch *in vivo*. Dazu wurden humane Tumorzellen in immundefiziente NOD/SCID-Mäuse xenotransplantiert und anschließend mit Sulforaphan behandelt. Dies führt zu einer Reduktion des Tumorwachstums sowie der *EZH2*-Expression, während die Apoptose induziert wurde (Fisher et al., 2015). Li et al. zeigen durch eine tägliche Injektion von Sulforaphan über zwei Wochen ebenfalls eine Suppression des Tumorwachstums und eine Reduktion der ALDH⁺-Zellpopulation im Tumor (Li et al., 2010). Tumorzellen, die aus den mit Sulforaphan behandelten Mäusen stammen, sind nicht in der Lage sekundäre Tumore in neuen Empfänger-mäusen auszubilden. Diese Beobachtung lässt sich mit den *in vitro*-Ergebnissen, dass Sulforaphan CSC und Progenitorzellen als Angriffsziel bevorzugt, vereinen und erklärt ebenfalls den signifikanten chemopräventiven Effekt (Kallifatidis et al., 2009).

Die Cisplatin-induzierte Nephropathie ist eine gefürchtete Komplikation während Chemo-

therapien. Es führt zu Entzündungen und zum Zelltod im Nierengewebe. Im Tierversuch konnte eine Abschwächung dieses Effektes durch eine Vorbehandlung der Tiere mit Sulforaphan gezeigt werden. Durch Cisplatin aktivierte, proinflammatorische Signalwege, wie p53, JNK, p38- α , TNF- α und NF- κ B, werden durch Sulforaphan so moduliert, dass der Cisplatin-induzierte Zelltod verhindert werden kann (Guerrero-Beltran et al., 2012). Durch eine synergistische Wirkung können bei Kombinationsbehandlungen von Sulforaphan mit konventionellen Chemotherapeutika Nebenwirkungen vermieden oder abgeschwächt werden. Phytochemische Extrakte, wie Sulforaphan, können die Krebstherapie durch ihre geringen Nebenwirkungen revolutionieren. Die aktuellen antitumorösen Chemotherapeutika sind oft sehr toxisch für die Organe und schwächen das Immunsystem des Patienten (Scarpa and Ninfali, 2015). Die Anti-CSC-Wirkung von Sulforaphan konnte in vielen soliden Tumoren nachgewiesen werden, wie im Pankreaskarzinom (Kallifatidis et al., 2009), Prostatakarzinom (Kallifatidis et al., 2011), duktales Karzinom *in situ* (Li et al., 2014), bronchiales Karzinom (Mokhtari et al., 2013) und im malignen Melanom (Fisher et al., 2015). Beim Prostatakarzinomrezidiv befindet sich Sulforaphan bereits in Phase II Studien. Die Behandlung mit Brokkoliextrakten führt zu einer geringeren Erhöhung von PSA im Vergleich zur unbehandelten Gruppe (Alumkal et al., 2015). Wirkungen von Sulforaphan auf das RCC wurden bisher jedoch nicht beschrieben.

1.4.3 mTOR-Inhibitoren

Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) gehört zum RAS/PI3K/PKB Signalweg, welcher eine wichtige Rolle im Zellwachstum, -überleben und in der Angiogenese spielt (Kornakiewicz et al., 2014; Chang et al., 2013). Dieser Signalweg ist im klarzelligen Nierenzellkarzinom und bei anderen Tumoren mit schlechter Prognose häufig verändert (Mattei et al., 2014). Everolimus und Temsirolimus sind spezifische Inhibitoren von mTOR und steigern bei Tumorpatienten das Gesamt- und das progressionsfreie Überleben (Motzer et al., 2008; Hudes et al., 2007). Temsirolimus wird in der RCC-Therapie bei schlechter Prognose verwendet, wobei diese schlechte Prognose durch verschiedene Risikofaktoren definiert wird, u.a. die multiple Metastasierung in verschiedene Organe (Hudes et al., 2007). Über die Hemmung der Synthese von VEGF-14 und HIF-1 α inhibiert Temsirolimus Angiogenese im Tumor (Mattei et al., 2014; Hudson et al., 2002). 2007 wurde Temsirolimus von der FDA als erster m-TOR-Inhibitor in der Therapie des fortgeschrittenen RCC zugelassen (Mihaly et al., 2012). Bis dahin war die Anwendung von IFN- α weit verbreitet, welches eine eingeschränkte Wirkung und schlechte Toleranz aufweist. Temsirolimus führt im Vergleich zu

IFN- α zu einem verbesserten Gesamtüberleben unter Patienten mit mRCC und schlechter Prognose (Hudes et al., 2007). Everolimus, ein Derivat von Sirolimus, ist ein immunsuppressiver mTOR-Inhibitor. Dieser ist seit 2009 von der FDA bei Patienten mit Versagen von VEGF-Inhibitoren als Therapie zugelassen. Die Behandlung mit Everolimus verlängert das progressionsfreie Überleben im Vergleich zum Placebo bei Patienten mit mRCC (Motzer et al., 2008). Der orale Verabreichungsweg führt im Vergleich zur intravenösen Injektion von Temsirolimus zu einer besseren *Compliance* bei den Patienten (Mihaly et al., 2012).

Aufgrund der verschiedenen molekularen Angriffspunkte könnte die Kombination von mTOR- und VEGF-Inhibitoren zur Verbesserung der Therapieantwort führen. Allerdings zeigt sich in Phase I Studien die Anwendung von Everolimus und Sunitinib in RCC-Patienten eine signifikant höhere Toxizität, die nur bei abgeschwächter Dosis tolerabel war (Molina et al., 2012). Währenddessen verursacht die Kombination von Bevacizumab und Everolimus bei nur 19% der Patienten eine Toxizität von Grad 3 von 4. Diese Kombinationstherapie verlängert das mediane Überleben. Jedoch zeigen Ergebnisse einer Phase II Studie widersprüchlicherweise eine eingeschränkte Effizienz und eine unerwartet hohe Toxizität bei der Kombination von Bevacizumab und Everolimus (Negrier et al., 2011). Auch ist die Wirkung der mTOR-Inhibitoren nicht beständig. Nur ein Teil der Patienten profitiert wesentlich von dieser Therapie (Battelli and Cho, 2011). Es werden Resistenzen gegen mTOR-Inhibitoren beschrieben. Bei den meisten Patienten kommt es während der Behandlung zu einer Progression der Erkrankung. Die verantwortlichen Mechanismen für diese Resistenzen sind nicht eindeutig geklärt. CSC und Interaktionen mit der Mikroumgebung spielen jedoch eine wichtige Rolle in der Angiogenese und Pathogenese (Kornakiewicz et al., 2014).

Der mTOR-Signalweg ist wichtig für die Homöostase in CSC und ist in verschiedenen Tumorzellen mit CSC-Eigenschaften aktiviert, wie im Prostata- und Nasopharyngealkarzinom (Chang et al., 2013; Yang et al., 2013; Ochocki and Simon, 2013). Die Expression von mTOR ist auch mit einer schlechten Prognose im Kolonkarzinom assoziiert.

Mit Hilfe von mTOR-Inhibitoren können die Fähigkeit zur Ausbildung von *spheres* und die ALDH-Aktivität unterdrückt werden und führen so zu einer Inhibition der CSC (Cai et al., 2014). Für Tumoren in Prostata, Nasopharynx und Kolon konnten Anti-CSC-Eigenschaften von mTOR-Inhibitoren nachgewiesen werden. Ob Temsirolimus und Everolimus zur Eradikation von CSC im RCC führen, bleibt unklar. Widersprüchliche Studien sprechen von einer signifikanten Steigerung des Gesamt- und des progressionsfreien Überlebens, andere Studien zeigten im Therapieverlauf Resistenzen gegenüber mTOR-Inhibitoren im RCC.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Dissertation ist es Wirkstoffe zu finden, die zur selektiven Inhibition von Tumorstammzellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom führen. Wie in der Einleitung dargestellt, sind Tumorstammzellen verantwortlich für die schlechte Prognose des klarzelligen Nierenzellkarzinoms. Zur Verhinderung von Rezidiven und Verringerung der Resistenz gegenüber konventionellen Therapeutika ist die gezielte Bekämpfung von Tumorstammzellen notwendig.

Dazu werden die Eigenschaften und Wirkungen der Inhibitoren Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus auf die Tumorzellen und Tumorstammzellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom untersucht. Es wurden bereits erfolgversprechende Wirkungen dieser Hemmstoffe auf Tumorstammzellen in anderen malignen Erkrankungen nachgewiesen. Teilweise finden die Substanzen bereits eine klinische Anwendung.

Um die selektive Inhibition auf Tumorstammzellen zu untersuchen, soll in einem Zytotoxizitätstest die hemmende Wirkung auf die Zellvitalität von Nierenzellkarzinomzellen und für Tumorstammzellen angereicherte Tumorzellpopulationen verglichen werden. Zur Quantifizierung der Wirkung von Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus auf Stammzellen wird die Fähigkeit der Tumorstammzellen zur Ausbildung von *spheres* und Zellkolonien mit charakteristischer Morphologie herangezogen. Charakteristisch für Tumorstammzellen sind die Entstehung von *spheres* unter serumfreien Bedingungen und die Genese von Zellkolonien mit charakteristischer Morphologie. Bei einer Inhibition von Tumorstammzellen ist eine Verminderung der Fähigkeit zur Ausbildung von *spheres* und Zellkolonien zu erwarten. Des Weiteren wurden in Vorarbeiten der Forschungsgruppe Tumorstammzellen mit Hilfe des Tumorstammzellmarkers CXCR4 identifiziert. Es sollen daher Veränderungen in der CXCR4-Expression mit und ohne Inhibitorbehandlung untersucht werden.

Mit Hilfe neuer Erkenntnisse zur selektiven Hemmung von Tumorstammzellen hoffen wir in Zukunft die Prognose des klarzelligen Nierenzellkarzinoms zu verbessern. Durch die Kombination von neuartigen Wirkstoffen, die zielgerichtet Tumorstammzellen eliminieren, und herkömmlichen Therapiestrategien erhoffen wir uns eine Verhinderung von Resistenzen und somit eine Verminderung von Rezidiven.

2 Materialien

2.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Analysewaage MC1 Research RC 210 P	Satorius AG, Göttingen
BD LSR II Flow Cytometer	BD Biosciences, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop Leica DM IRBE	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Fluorometer FluorStar OPTIMA	BMG Labtech GmbH, Ortenberg
Fotokamera AxioCam	Zeiss, München
Fotokamera Leica DFC 300 FX	Leica Microsystems GmbH, Heerbrugg
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Biberach
Gefrierschrank HFU 86 (-80°C)	Heraeus Instruments, Hanau
Inkubationsschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Kühlschrank Kirsch (4°C)	Bosch, Deutschland
Messschieber Absolut Digimatic	Mitutoyo Corporation, Neuss
Mikropipetten Masterpette (1000 µl)	Koperachemie, Iserlohn
Mikropipetten Pipetman (2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl)	Gilson, Frankreich
Mikroskop Leica DM IL	Leica Microsystems GmbH, Mannheim
Mikroskop Axiovert 35	Zeiss, München
Mr. Frosty Freezing Container	Nalgene, Sigma-Aldrich, München
Multikanalpipette (20 µl bis 200 µl)	AbiMed GmbH, Langenfeld (Rheinland)
Multikanalpipette (25 µl bis 200 µl)	Dunn Labortechnik GmbH, Asbach
Multipette plus	Eppendorf, Penzberg
Neubauerzählkammer	Optik Labor, Friedrichsdorf
Pipettierassistent Pipetboy accu	Hirschmann, Neckartenzlingen
Präparierbesteck	Aesculap, Tuttlingen
Rasierer Contura	Wella Professionals, Schwalbach
Schüttler MTS 4	Janke und Kunkel GmbH, Staufen
Sterilbank HERAsafe	Heraeus Instruments, Hanau
Stickstofftank Chronos Biosafe	Messer Griesheim, Sulzbach
Trockenschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Varioklav Dampfsterilisation	Labortechnik, Oberschleißheim bei München
Vortex	IKA-Works, INC. Wilmington, USA

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
<i>Cell Culture Tube</i> , 12 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
<i>Combi-Tips</i> 200 µl	Eppendorf, Hamburg
Einfrierröhrchen <i>CryoTube Vials</i>	Nunc GmbH und Co. KG, Wiesbaden
Einmal-Injektions-Kanülen (30G)	B Braun, Melsungen
Einwegpipetten, steril (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml und 50 ml)	BD Falcon, Heidelberg
Filtereinheiten Millex-GP 0,22 µm	Merck Millipore, Irland
<i>Microtubes Loose</i> 1,2 ml	alpha laboratories, Karlsruhe
Handschuhe Latex <i>Powder-FREE</i>	SATRA Technology Centre, UK
Haut-Desinfiziens Cutasept F	BODE Chemie GmbH, Hamburg
Parafilm M	Bemis Flexible Packaging, Neenah, USA
Pipettenspitzen (10 µl)	StarLab, Hamburg
Pipettenspitzen (200/1000 µl)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Reagenzröhrchen 15 ml, 50 ml	BD Falcon, Heidelberg
Spritzen 50 ml	BD Perfusion, Heidelberg
Spritzen Plastipak 50 ml	Becton Dickinson, Irland
<i>Ultra-low-attachment 96-well-plates</i>	Corning Costar, Amsterdam, Niederlande
<i>Ultra-low-attachment cell culture flasks</i> (25 cm ² und 75 cm ²)	Corning Costar, Amsterdam, Niederlande
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² und 175 cm ²)	BD Falcon, Heidelberg
Zellkulturplatten (6-well, 12-well)	BD Falcon, Heidelberg
Zellkulturplatten (96-well, Flachboden)	TPP, Schweiz
Zellkulturplatten (96-well, U-Boden)	TPP, Schweiz
Zellkulturschale 60 mm × 15 mm	BD Falcon, Heidelberg

2.3 Chemikalien, Reagenzien und Antikörper

Antikörper	Hersteller
APC Mouse Anti-Human CD184	BD Pharmingen, Heidelberg
Fixable Blue Dead Cell Stain Kit	Invitrogen, Karlsruhe
PE Mouse Anti-Human CD184	BD Pharmingen, Heidelberg
Färbungen	Hersteller
CellTiter Blue – Cell Viability Assay	Promega, Mannheim
Methylene Blue, 0.05 wt.	Sigma-Aldrich, München
Trypan Blue Solution (0.4%)	Sigma-Aldrich, München
Substanzen	Hersteller
Everolimus (EVR)	LC Laboratories, Woburn, MA, USA
R-Sulforaphane (SFN)	LKT Laboratories, St. Paul, MN, USA
Salinomycin (SLM)	Sigma-Aldrich, München
Sunitinib (STB)	LC Laboratories, Woburn, MA, USA
Temsirolimus (TSR)	LC Laboratories, Woburn, MA, USA
Tierversuchsmaterialien	Hersteller
DMEM + GluaMAX	Gibco Life Technologies, UK
Formaldehydlösung 4%	Microcos GmbH, Garching bei München
Isofluran Forene 100 %	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Matrigel Basement	BD Biosciences, Heidelberg
Mäuse NOD.CB17-Prkdc ^{scid} /J	Charles River, Sulzfeld
Tissue-Tek O.C.T Compound	Sakura Finetek, VWR International GmbH, Darmstadt
Zellkultur	Hersteller
0.5% Trypsin-EDTA	Gibco Life Technologies, UK
Ethanol 70%, 80%, 99%	CLN GmbH, Deutschland
PBS, pH 7,4	Invitrogen, Karlsruhe
StemPro Accutase	Gibco Life Technologies, USA, PAA Laboratories GmbH

2.4 Medien und Puffer

Menge	Citrat-Puffer	Hersteller
15,53 g	Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
7,6 g	tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
100 ml	Wasser	deionisiert, autoklaviert

Menge	FACS-Puffer	Hersteller
4 mM	EDTA pH 8.0	Ambion, Oberursel
1 %	<i>Fetal Bovine Serum</i> Gold	GE Healthcare, PAA Laboratories GmbH, Cölbe
25 mM	Hepes	Gibco Life Technologies, UK
95 %	PBS, pH 7,4	Invitrogen, Karlsruhe
0,1 %	Sodium azide	Sigma-Aldrich, München

Menge	Serumfreies Medium	Hersteller
2 %	<i>B27 Serum-Free Supplement</i>	Invitrogen, Karlsruhe
96,84 %	DMEM/F-12 (1:1) (1X)	Gibco Life Technologies, UK
0,08 %	<i>Epidermal Growth Factor, human</i>	Sigma-Aldrich, München
0,08 %	<i>Fibroblast Growth Factor Basic, human</i>	Sigma-Aldrich, München
1 %	Insulin-Transferrin-Selenium-X	Gibco Life Technologies, USA

Menge	Tumorzellmedium	Hersteller
5 ml	200 mM L-Glutamine	Gibco Life Technologies, UK
50 ml	<i>Fetal Bovine Serum</i> Gold	GE Healthcare, PAA Laboratories GmbH, Cölbe
5 ml	<i>MEM Non-essential Amino Acid Solution</i>	Gibco Life Technologies, UK
500 ml	RPMI Medium 1640	Gibco Life Technologies, UK
5 ml	Sodium Pyruvate 100 mM	Gibco Life Technologies, UK

2.5 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Proliferationsrate
Renal Cell Cancer 26 (RCC-26) freundlicherweise von Prof. D. Schendel zur Verfügung gestellt	Patient aus Großhadern, LMU, München, klarzelliges Nierenzellkarzinom, Stadium I (pT1 N0 M0 G2), langsame Progression, rezidivfreies Intervall von 9 Jahren	langsames Wachstum in Zellkultur, Teilungsrate ca. 72 Stunden
Renal Cell Cancer 53 (RCC-53) freundlicherweise von Prof. D. Schendel zur Verfügung gestellt	Patient aus Großhadern, LMU, München klarzelliges Nierenzellkarzinom, Stadium IV (pT2 N1 Mx G2-3), schnelle Progression	hohe Proliferations- kapazität in Zellkultur, Teilungsrate ca. 24 Stunden
Sloan Kettering Renal Cancer 17 (SK-RC-17)	Geschenk von J. Vissers, Nijmegen, stammt aus dem <i>Sloan Kettering Cancer Center</i> in New York, klarzelliges Nierenzellkarzinom	schnelles Wachstum in Zellkultur, Teilungsrate ca. 24 Stunden

2.6 Software und Internet

Software/Webseite	Entwickler/Link
AxioVision (AxioVs30)	Zeiss, Jena
FACS Diva	BD Bioscience, Heidelberg
FloJo	Tree Star, San Carlos, USA
GraphPad Prism	La Jolla, USA
LaTeX	Leslie Lamport, USA
MacBiophotonics Image J	McMaster Biophotonics Facility, USA
MatLab	The MathWorks, USA
OPTIMA Control	BMG Labtech GmbH, Ortenberg
OPTIMA Mars Data Analysis	BMG Labtech GmbH, Ortenberg
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/
XnView	Gougelet Pierre-Emmanuel, Reims, Frankreich

3 Methoden

3.1 Methoden der Zellkultur

3.1.1 Einfrieren der Zellen

Zum Einfrieren wurden vorrangig Zellen verwendet, die sich in einem guten Proliferationszustand befanden. Sie waren weder konfluent noch zu dünn ausgesät, so dass die Proliferationsrate vermindert wird. Dazu wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Mit EDTA-Trypsin wurden die Zellen von der Kulturflasche abgelöst und mit PBS in ein Reagenzröhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 410x g für vier Minuten. Das PBS wurde entfernt und das Zellpellet in 5 ml frischem PBS resuspendiert. Danach wurden die Zellen ausgezählt, es wurden ca. 1 Millionen Zellen pro Einfrierröhrchen aufbewahrt. Ein weiteres Mal wurde zentrifugiert und das PBS entfernt. Anschließend wurden pro geplantem Einfrierröhrchen 0,5 ml RPMI 1640 und 0,5 ml 20%iges DMSO in das Reagenzröhrchen gegeben. Nun wurden die Zellen zügig à 1 ml Zellsuspension pro vorgekühltes Einfrierröhrchen verteilt. DMSO verhindert die Kristallbildung des Wassers in den Zellen, hat allerdings auch eine toxische Wirkung auf die Zellen, so dass ein schnelles Arbeiten wichtig ist, um die Zeit zu minimieren, in der die Zellen dem DMSO ausgesetzt sind. Die Einfrierröhrchen wurden schließlich in *Mr. Frosty Freezing Container* gestellt, welche bei -20°C vorgekühlt wurden. Diese Boxen enthalten Isopropanol, um eine langsame kontinuierliche Abkühlung der Zellen von 1°C pro Minute zu gewährleisten. Die *Mr. Frosty Freezing Container* wurden in einem Gefrierschrank bei -80°C aufbewahrt und die Zellen nach 24 Stunden in einen Stickstofftank überführt.

3.1.2 Auftauen der Zellen

Die Tumorzellen wurden in einem Stickstofftank bei -196°C in der Gasphase aufbewahrt. Zur Vorbereitung wurden 5 ml Tumorzellmedium (siehe Tabelle in Abschnitt 2.4) in einem 15 ml Reagenzröhrchen vorgelegt. Das aus dem Stickstofftank entnommene Einfrierröhrchen wurde im Wasserbad bei 37°C erwärmt bis ein kleines Eisstückchen zurückblieb. Die Zellsuspension wurde schrittweise in 10 ml Medium verdünnt. Dieser Schritt wurde möglichst zügig durchgeführt, um den toxischen Effekt des DMSOs auf die Zellen zu minimieren. Dazu wurde zunächst 1 ml Medium in das Einfrierröhrchen pipettiert. Die Zellsuspension

wurde anschließend in das vorbereitete Reagenzröhrchen mit 5 ml Medium überführt. Nach dem Ausspülen des Einfrierröhrchens wurde das Reagenzröhrchen auf 10 ml aufgefüllt und bei 410x g für vier Minuten zentrifugiert, um das DMSO-haltige Einfriermedium zu entfernen. Das alte Medium wurde entfernt und das Zellpellet in 5 ml frischem Medium resuspendiert. Nach dem Auszählen wurden die Zellen entsprechend der Zellzahl in Kulturflaschen mit einer Anheftfläche von 25, 75 oder 125 cm² gegeben und bei 37 °C inkubiert.

3.1.3 Zellkultivierung und Zellzählung

Die Tumorzellen wurden in Tumorzellmedium in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zusammensetzung des Tumorzellmediums ist in der Tabelle in Abschnitt 2.4 dargestellt. Nach zwei bis drei Tagen wurde das Medium erneuert. Dazu wurde das verbrauchte Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Kulturflasche wurde je nach Größe mit frischem Zellmedium gefüllt und wieder in den Inkubationsschrank gestellt. Bei starker Konfluenz oder gelber Verfärbung des Mediums wurden die Zellen gesplittet.

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden die Zellen in einem bestimmten Volumen Medium oder PBS suspendiert. Es wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypan-Blau vermischt und auf die Kante des Deckglases der Neubauer Zählkammer pipettiert (siehe Abbildung 5). Durch Kapillarkräfte zwischen Deckglas und Zählkammer wird die Suspension eingesogen, so dass sich ein Volumen von 0,1 µl in dem markierten Bereich befindet. Unter dem Lichtmikroskop wurden die vitalen Zellen in den vier Quadranten des Neubauer-Gitters gezählt, die sich durch eine helle Farbe von den toten blau gefärbten Zellen abheben. Der Mittelwert der vier Quadrate wurde mit dem Verdünnungsfaktor 2 und mit 10⁴ multipliziert, wodurch sich die mittlere Zellzahl pro Milliliter Suspensionsvolumen ergibt.

3.1.4 Splitten und Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von etwa 90% gesplittet. Dazu wurde das verbrauchte Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Um die adhärenen Zellen von der Kulturflasche zu lösen, wurde EDTA-Trypsin oder Accutase verwendet. Durch eine fünfminütige Inkubation konnte der Ablösevorgang beschleunigt werden. Die freibeweglichen Zellen wurden mit PBS abgespült, in ein Reagenzröhrchen gegeben und bei 410x g für vier Minuten

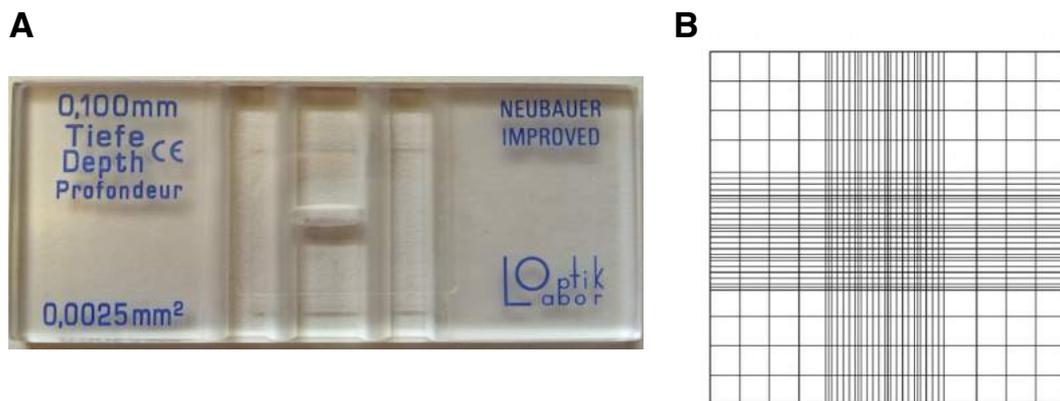


Abbildung 5: **Neubauer Zählkammer.** Mit Hilfe der Neubauer Zählkammer konnte die Zellzahl einer Zellsuspension bestimmt werden (A). Dazu wurden die lebenden Zellen in den äußeren vier Quadranten, die wiederum aus 16 Einzelquadranten bestehen, unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und der Durchschnittswert errechnet (B) (www.laborshop24.de/Glaswaren-Glasbehaelter-Laborglaeser/Zaehlkaemern/).

abzentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und die Zellen ausgezählt. Je nach Menge wurden die Zellen in mehrere oder größere Kulturflaschen übertragen. Zur Passage wurde eine Einheit dazu addiert.

3.2 Drug sensitivity assay

Der *drug sensitivity assay* ist eine Methode zur Bestimmung der Zellvitalität in Abhängigkeit der Substanzkonzentration. Dazu wurden die, wie oben beschrieben, gezüchteten Tumorzellen aus ihren Kulturflaschen geerntet. Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Zur Ablösung der Zellen wurde Accutase verwendet, da es die Zellen schonender ablöst als das bisher verwendete EDTA-Trypsin. Die freischwimmenden Zellen werden mit PBS abpipettiert und in ein Reagenzröhrchen überführt. Nach dem Zentrifugieren wurde das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert und die Zellen ausgezählt. Es wurden für diesen Versuch Mikrotiterplatten mit 96 *wells* verwendet. Für einen Tag Behandlung wurden 1500 Zellen pro *well* und für sieben Tage Behandlung wurden 300 Zellen pro *well* ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden konnten sich die Zellen erholen und adhären. Anschließend wurde das Medium entfernt und durch in Zellmedium verdünnte Inhibitoren ersetzt.

Für zwei zu testende Substanzen wurde eine 96-*well*-Mikrotiterplatte verwendet. Die *wells* am Rand wurden nicht verwendet, um eine Ergebnisverfälschung durch stärkere Verdunstung und damit eine Schwankung der Substanzkonzentration zu vermeiden. Für jeden Wirkstoff wurden die Versuche in Triplikaten durchgeführt. Es wurden für jede Substanz drei Leerwerte für die Mediumkontrolle ohne Zellen angelegt. Drei weitere *wells* dienten zur Kontrolle, d.h. die darin enthaltenen Tumorzellen wurden ausschließlich mit Medium kultiviert. Für die nächsten acht Reihen wurden die Tumorzellen mit aufsteigender Inhibitorkonzentration behandelt. Die Konzentrationen waren abhängig von der Behandlungsdauer.

<i>well</i> -Reihennummer		3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 Tag	C in μM	0,00	1,25	2,50	5,00	10,0	20,0	40,0	80,0	160
7 Tage	C in μM	0,00	0,20	0,40	0,80	1,60	3,20	6,40	12,8	25,6
7 Tage (SLM)	C in nM	0,00	1,25	2,50	5,00	10,0	20,0	40,0	80,0	160

Tabelle 2: **Verwendete Substanzkonzentrationen.** Bei einer Behandlungszeit von 24 Stunden wurden für SFN, SLM, TSR und EVR Konzentrationen von 0 μM bis 160 μM in Tumorzellmedium verdünnt. Die Behandlungen mit einer Inkubationszeit über sieben Tage erforderten geringere Konzentrationen von 0 μM bis 25,6 μM für SFN, TSR und EVR sowie 0 μM bis 0,16 μM für SLM.

Nach einer Behandlungszeit von einem bzw. sieben Tagen wurden ohne Entfernung des Mediums oder Waschschrte 20 μl *CellTiter-Blue* direkt zu jedem *well* hinzugefügt. Lebende Zellen sind in der Lage, das im Farbstoff enthaltene Resazurin, einen Redoxfarbstoff, in das fluoreszierende Resofurin umzuwandeln, während tote Zellen ohne Stoffwechsel nicht in der Lage sind, ein Fluoreszenzsignal zu entwickeln. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde kann mit Hilfe des fluoreszierenden Endproduktes die Quantität der lebenden Zellen bestimmt werden. Das Signal wurde im Fluorometer FluorStar OPTIMA bei einer Wellenlänge von 560 nm Exzitation und 590 nm Emission detektiert. Das Reagenz ist für die Zellen nicht toxisch, dadurch sind flexible Inkubationszeiten möglich. Von den gemessenen Werten wurde der Leerwert subtrahiert. Die erhaltenen Werte der behandelten Messungen wurden auf die Kontrolle normiert und in Abhängigkeit von der Konzentration dargestellt. Zur Auswertung der Daten wurden mit GraphPad Prism die Werte sortiert und es wurden die Mittelwerte mit Standardfehler grafisch dargestellt. Nun wurde die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) für jeden Inhibitor ermittelt, also die Konzentration bei der 50% der Zellen überleben. Dazu wurden die Daten in das Programm MatLab eingegeben und die IC_{50} -Konzentration mit Hilfe eines *cursor*s am Graphen bestimmt. Zur grafischen Darstellung der IC_{50} -Konzentrationen wurde für jede Einzelmessung in MatLab eine Vitalitätskurve erstellt und mit Hilfe des *cursor*s die IC_{50} ermittelt. Schließlich wurden auch die Mittelwerte der IC_{50} -Konzentrationen mit Standardfehler grafisch dargestellt. Unter Verwendung des Multiplen *t*-Test mit einem α -Wert von 0.05 wurde die statistische Signifikanz geprüft.

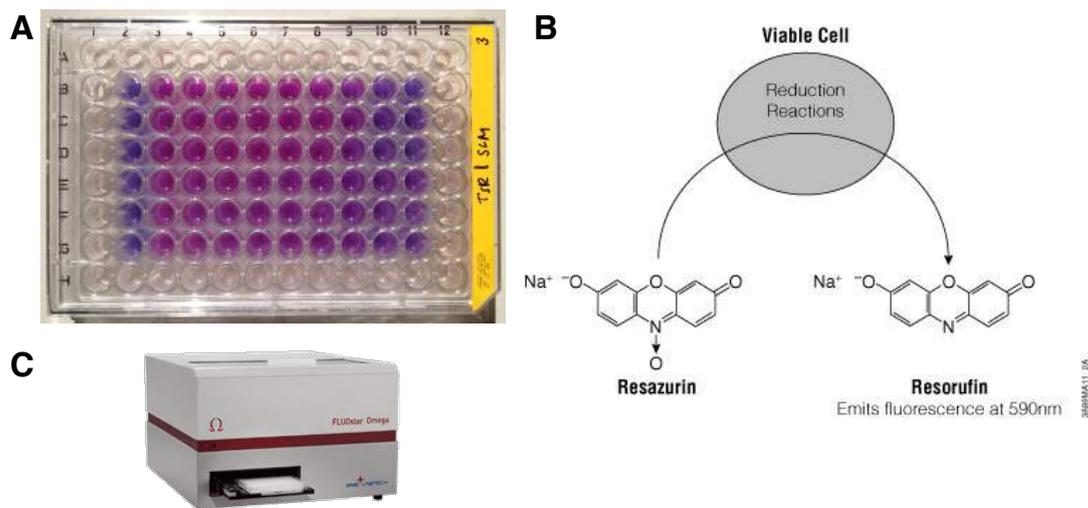


Abbildung 6: **Bestimmung der Zellvitalität beim *drug sensitivity assay***. Beispielhafte Versuchsanordnung für Salinomycin (Reihe B bis D) und Temozolomid (Reihe E bis G) nach Hinzugabe von *CellTiter-Blue* und einer einstündigen Inkubation. In Spalte zwei befinden sich die Blanks ohne Tumorzellen. Von Spalte drei bis Spalte elf sind die nach Tabelle 2 abnehmenden Wirkstoffkonzentrationen zu finden (A). Schematische Darstellung der Umwandlung des Redoxfarbstoffes Resazurin in das fluoreszierende Resorufin durch eine lebende Zelle (B) (www.promega.de/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/cell-viability/). Gerät FluorStar OPTIMA zur Messung der Fluoreszenz mit eingelegter Mikrotiterplatte (C) (www.brennanco.ie/brennanco/main/Scientific_Microplate_Readers_New.htm).

3.3 Colony formation assay

Beim *colony formation assay* werden die Tumorzellen so dünn ausgesät, dass nach einer längeren Wachstumsphase aus einer Tumorzelle eine Zellkolonie entsteht. Unter einem Lichtmikroskop können u.a. die Anzahl der Kolonien ausgezählt sowie verschiedene Zellkolonietypen bestimmt werden. Zur Durchführung des *colony formation assays* wurden 12-well-Mikrotiterplatten verwendet. Die Zellen wurden mit Hilfe von Accutase von den Kulturflaschen abgelöst, mit PBS gewaschen und in der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Es wurden 300 Zellen in jedes *well* mit 2 ml Zellmedium ausgesät. Um ein Anreichern der Tumorzellen an den Rändern der *wells* durch Kapillarkräfte zu verhindern, ist es notwendig ausreichend Medium einzufüllen. Es wird dadurch eine regelmäßige Verteilung der Tumorzellen erreicht. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden zur Erholung der adhären-ten Zellen wird das Medium ausgetauscht. Für jede Versuchsreihe wird eine Kontrolle ohne Wirkstoff, eine halbe IC_{50} und eine ganze IC_{50} Konzentration angesetzt.

Die Mikrotiterplatte wurde für sieben Tage im Brutschrank inkubiert. Die dünn verteilten Tumorzellen bildeten im Verlauf der Woche Kolonien. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Kolonien angefärbt. Dazu wurde das Tumorzellmedium abpipettiert und die Zellen mit PBS gewaschen. Pro *well* wurde 1 ml Methylen-Blau zugefügt. Die Platten wurden für eine Stunde unter stetigem Schütteln gefärbt. Anschließend wurde der Farbstoff abgespült und die Mikrotiterplatte für zehn Minuten in den Trockenschrank gestellt. Nun wurden die Zellkolonien unter dem Mikroskop betrachtet. In jedem *well* wurden die Kolonien ausgezählt und es wurden dabei die verschiedenen Zellkolonietypen Holo-, Mero- und Paraklone unterschieden. Zur Berechnung der Kolonisationseffizienz wurde die Anzahl der Zellkolonien pro *well* durch die Anzahl der ausgesäten Zellen, also 300 Tumorzellen, dividiert.

3.4 Sphere formation assay

3.4.1 Kultivierung und Dissoziation von *spheres*

Der *sphere formation assay* ist eine Methode zur Anreicherung von Tumorstammzellen. Zur Kultivierung von *spheres* wurden *ultra-low-attachment*-Kulturflaschen und serumfreies Medium verwendet. Die Zusammensetzung des serumfreien Mediums ist in der Tabelle in Abschnitt 2.4 dargestellt.

Die Tumorzellen wurden aus den Kulturflaschen geerntet und mit PBS gewaschen. Auch hier wird Accutase für eine schonende Ablösung der Tumorzellen verwendet. In einer 25 cm² *ultra-low-attachment*-Flasche wurden 120.000 Zellen in 5 ml serumfreiem Medium und in einer 75 cm² *ultra-low-attachment*-Flasche wurden 360.000 Zellen in 12 ml serumfreiem Medium kultiviert. Unter Verwendung von serumfreiem Medium stehen den Tumorzellen weniger Wachstumsfaktoren zur Verfügung. Durch die Inkubation in speziell beschichteten Mikrotiterplatten oder Zellkulturflaschen wird die Adhärenz der Tumorzellen an die Gefäßoberfläche verhindert. Nach ca. sieben Tagen Inkubationszeit entsteht aus einer Tumorstammzelle ein *sphere*. Die Suspension aus *spheres* wurde vorsichtig mit Einwegpasteurpipetten entnommen und in ein Reagenzröhrchen übertragen. Die *ultra-low-attachment*-Kulturflaschen wurden zweimal mit PBS gespült, um möglichst alle zurückgebliebenen *spheres* zu entnehmen. Eine Ablösung durch Accutase oder EDTA-Trypsin war nicht nötig, da sich die *spheres* frei im Medium bewegen können und nicht an der Kulturflasche adhären. Um die *spheres* vom Medium zu trennen, erfolgte eine Zentrifugation bei 410x g für vier Minuten. Anschließend wurde das Medium-PBS-Gemisch langsam mit einer Pipette entfernt,

da das aus *spheres* bestehende Zellpellet leicht löslich war und nicht mit entfernt werden sollte. Durch eine Hinzugabe von Accutase wurden die einzelnen Tumorzellen im *sphere* voneinander gelöst. Um diesen Vorgang zu beschleunigen wurde das Reagenzröhrchen mit Accutase für zehn Minuten in ein Wasserbad gestellt. Zu den nun separierten Zellen wurde PBS gegeben und ein weiteres Mal zentrifugiert. Nach erneuter Abnahme des Überstandes mit einer Pipette wurde das Zellpellet in 5 ml frischem PBS oder Medium resuspendiert und die Zellen ausgezählt.

3.4.2 Drug sensitivity assay mit dissoziierten *spheres*

Der Zytotoxizitätsassay kann sowohl mit adhärennten Zellen als auch mit dissoziierten *spheres* durchgeführt werden. Die über sieben Tage im serumfreien Medium kultivierten *spheres* wurden geerntet, mit PBS gewaschen und mit Accutase dissoziiert. Nach dem Auszählen wurden, wie bei den adhärennten Zellen, 1500 Zellen pro *well* in einer 96-*well*-Mikrotiterplatte ausgesät. Die Platte wurde für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit konnten sich die Zellen erholen und sich am Boden der Zellkulturflasche adhärennten. Daher wird im Folgenden von adhärennten dissoziierten *spheres* gesprochen. Am nächsten Tag erfolgte der Austausch des Mediums. Die Tumorzellen wurden mit den Hemmstoffen in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden behandelt (0 μ M bis 160 μ M). Es wurden keine längeren Inkubationen durchgeführt, da sich ansonsten die dissoziierten *spheres* ausdifferenzieren und ihre Stammzeleigenschaft verlieren würden. Zur Bestimmung der Zellvitalität wurden 20 μ l CellTiter-Blue hinzugefügt und für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Zum Schluss erfolgte die Messung der Fluoreszenz am Fluorometer FluorStar OPTIMA. Es erfolgte ebenfalls, wie bei den adhärennten Zellen, eine grafische Darstellung der Messwerte sowie die Ermittlung der mittleren inhibitorischen Konzentrationen.

3.4.3 Sphere formation assay nach sieben-tägiger Behandlung

Zur Durchführung dieses Experimentes wurden fünf Kulturflaschen mit gleicher Zellanzahl und gleichem Volumen Zellmedium angelegt. Es wurden 500.000 Zellen aus einer 175 cm² Zellkulturflasche geerntet, mit PBS gewaschen und ausgezählt. Dann wurden je 100.000 Zellen in eine 75 cm² Kulturflasche mit 12 ml Medium überführt. Die Kulturflaschen wurden anschließend im Brutschrank gelagert. Nach 24 Stunden wurde das alte Medium entfernt und neues Medium mit den inhibitorischen Substanzen (IC₅₀-Konzentration) hinzugefügt.

Eine Kulturflasche diente zur Kontrolle und wurde mit reinem Medium ohne Wirkstoff inkubiert. Nach vier Tagen wurde das alte Medium entfernt und mit frischem Medium plus Substanz (IC_{50}) ersetzt. Nach weiteren drei Tagen, also einer Gesamtbehandlungszeit von sieben Tagen, wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gespült. Zur Ablösung der Zellen wurde Accutase verwendet. Die Zellsuspension wurde mit PBS in ein Reagenzröhrchen übertragen und zentrifugiert. Nach der Resuspendierung in frischem PBS, wurden die Zellen ausgezählt. Um die Fähigkeit zur Ausbildung von *spheres* der behandelten Zellen zu testen, wurden diese in serumfreies Medium versetzt und in 96-*well-ultra-low-attachment*-Mikrotiterplatten kultiviert. Je Kulturflasche wurden 18.000 Zellen entnommen und in zwölf *wells* mit 1500 Zellen pro *well* ausgesät. Nun erfolgte eine Inkubation von sieben Tagen. Schließlich wurden die *spheres* pro *well* verblindet gezählt und der Mittelwert für die 12-*wells* errechnet. Es erfolgte mit Hilfe einer Skala im Okular eine Unterscheidung in große und kleine *spheres*. Die Grenze des *sphere*-Durchmesser zur Differenzierung in große und kleine *spheres* beträgt 100 μm .

3.4.4 Sphere formation assay während sieben-tägiger Behandlung

Bei diesem Versuch erfolgte die Behandlung mit den Wirkstoffen in verschiedenen Konzentrationen während dem *sphere formation assay*. Dazu wurden 1500 Zellen pro *well* in einer *ultra-low-attachment*-Mikrotiterplatte in 100 μl serumfreiem Medium ausgesät. Nach 24 Stunden wurden 100 μl serumfreies Medium plus Substanz zugefügt. Zu der Kontrollreihe wurde lediglich serumfreies Medium ohne Inhibitor gegeben. Als Endkonzentrationen ergaben sich eine ein-, zwei-, vier- und achtfache mittlere inhibitorische Konzentration IC_{50} . Es erfolgte eine Inkubationszeit von sieben Tagen. Schließlich wurden die *spheres* pro *well* ausgezählt und die jeweiligen Mittelwerte der Hexaplikate berechnet.

3.5 Durchflusszytometrie

3.5.1 Allgemeines Prinzip

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur phänotypischen Charakterisierung von Zellen. In den folgenden Versuchen wurde die Durchflusszytometrie vorrangig dazu verwendet, um die Expression von Oberflächenmarkern auf den Zellen darzustellen. Dazu werden die

Zellen mit an Farbstoff konjugierten Antikörpern markiert und einzeln an einem Laser vorbei geschleust. Das durch die Zellen gestreute Licht sowie die Fluoreszenzsignale der Antikörper werden von Detektoren erfasst, so dass der Anteil an Zellen mit dem zu bestimmenden Oberflächenmarker erfasst werden kann.

3.5.2 Durchführung der Durchflusszytometrie

Die zu testenden Tumorzellen wurden aus Kulturflaschen geerntet, mit PBS gewaschen und ausgezählt. Pro FACS-Röhrchen wurden 500.000 Zellen in 100 μ l PBS resuspendiert und mit 50 μ l *Blue Dye* für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Der Lebend-Tod-Farbstoff *Blue Dye* wurde zuvor 1:50 in PBS verdünnt. Nach der Inkubationszeit wurden 800 μ l FACS-Puffer (siehe Tabelle in Abschnitt 2.4) hinzugefügt und bei 410x g für vier Minuten zentrifugiert, um den nicht gebundenen Farbstoff auszuwaschen. Der FACS-Puffer ermöglicht einen stabilen pH-Wert, verhindert das Klumpen der Zellen und inhibiert die Zellatmung. Zu den in 100 μ l FACS-Puffer resuspendierten Zellen wurden nun 1 μ l *APC Mouse Anti-Human CD184 (CXCR4)* in einer Konzentration von 25 μ g/ml hinzugefügt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte erneut ein Waschschrift mit FACS-Puffer. Die Zellen wurden schließlich in 200 μ l FACS-Puffer resuspendiert und im Kühlschrank für maximal eine Stunde gelagert, bis die Messung am Durchflusszytometer BD LSR II Flow Cytometer mit dem Programm FACS-Diva erfolgte.

3.5.3 Bestimmung der CXCR4-Expression

Zur Auswertung der Daten wurde die Software FloJo verwendet. Dazu wurden im ersten Schritt die Tumorzellen von Zellfragmenten abgegrenzt, die sich durch ihre kleinere Fläche in der Darstellung *Forward Scatter (FSC-A)* zu *Side Scatter (SSC-A)* in der Nähe der Ordinate befanden. Es folgte die Bestimmung der lebenden Zellen. Durch die Färbung mit dem Farbstoff *Blue Dye* konnten tote, *Blue dye* positive Zellen abgegrenzt werden. Anschließend erfolgte das *Gating* von Einzelzellen. Die Zellen wurden mittels FSC-A (*area*) gegen FSC-H (*height*) dargestellt. FSC ist ein Maß für das Volumen der Zelle. Verklumpte Zellen besitzen trotz einer geringen Höhe eine relativ große Oberfläche und wurden nach diesem Kriterium ausgegrenzt. Die übrig gebliebenen Zellen waren lebende, einzelne Tumorzellen, deren Anteil an CXCR4-Oberflächenmarker bestimmt wurde. Dazu wurde in der ungefärbten Kontrolle ein *Gate* gesetzt, welches $\leq 0.1\%$ der Zellen enthält und schließlich auf die gefärbte

Probe übertragen wurde. Die CXCR4-Expression kann nun abgelesen werden (siehe Abbildung 7).

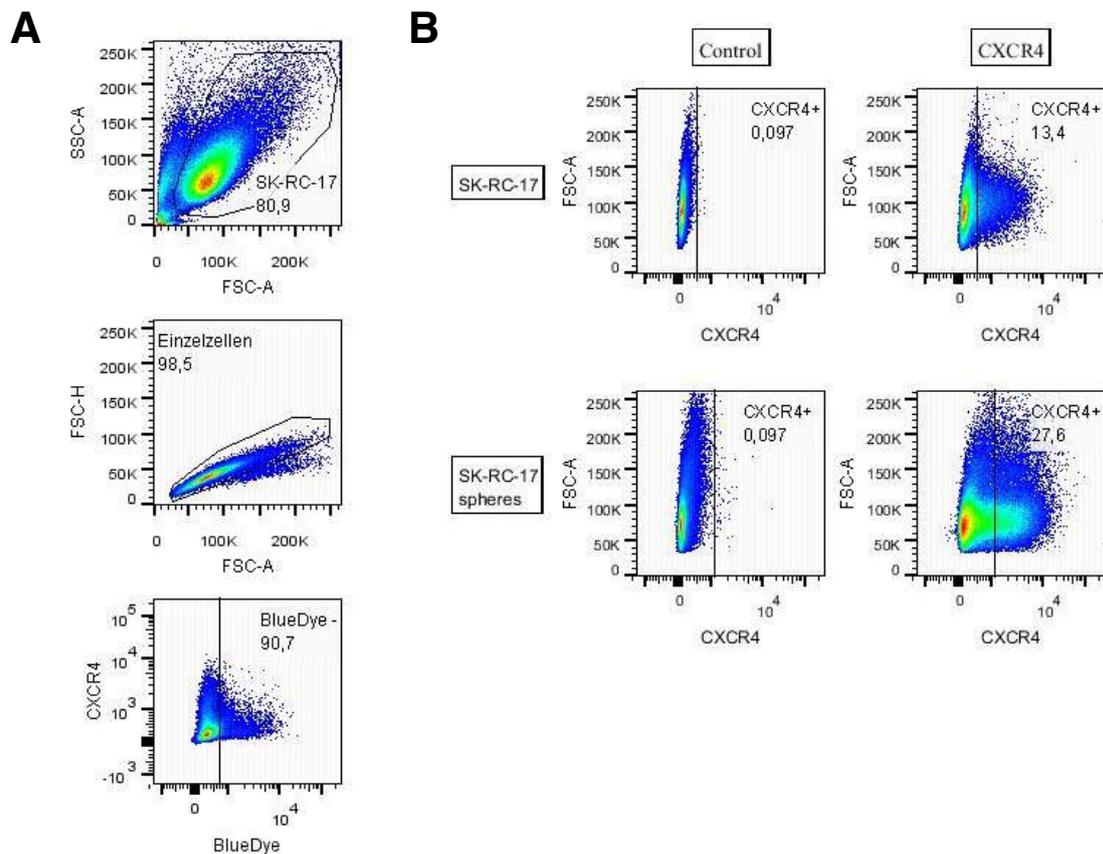


Abbildung 7: **Auswertung der Daten der Durchflusszytometrie.** Trennung der Tumorzellen von Zellfragmenten, Abgrenzung der lebenden Zellen von toten mittels *Blue Dye* und Auswahl der Einzelzellen (A). Bestimmung der CXCR4-Expression am Beispiel für SK-RC-17 und dissoziierte *spheres* von SK-RC-17. Dazu wird ein *Gate* in der Kontrollprobe gesetzt, die $\leq 0.1\%$ der Zellen enthält. Dieses *Gate* wird anschließend auf die zu testende Population übertragen und die CXCR4-Expression ermittelt (B).

3.6 Tierversuche

3.6.1 Tierhaltung

Die Tierversuchgenehmigung erfolgte durch die Regierung von Oberbayern (GZ. 55.2-1-54-2531-44-10). Für die Tierversuche wurden sechs bis neun Wochen alte NOD/SCID-

Mäuse verwendet. Die Tiere wurden im Walter-Brendel-Zentrum unter pathogenfreien Bedingungen mit vier bis fünf Tieren pro Käfig gehalten. Wasser und Futter erhielten die Tiere *ad libitum*. Durch Markierungen am Ohr wurden die Mäuse nummeriert. Die Rasur der Flanken diente der genaueren Tumorgrößenbestimmung sowie der Injektion der Tumorzellen und der subkutanen Verabreichung der Hemmstoffe. Vor den Injektionen wurden die Mäuse mit Isofluran betäubt und die Haut bzw. das Fell mit Haut-Desinfektionsmittel desinfiziert.

3.6.2 Subkutane Injektion der Tumorzellen

Zur Injektion wurden RCC-53-Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und ausgezählt. Die Resuspendierung erfolgte in DMEM/F12 und Matrigel im Verhältnis 1:1. Die Suspension wurde in Eis gehalten, damit das Matrigel flüssig bleibt. Es wurde in jede Flanke der Mäuse 40.000 Zellen in einem Volumen von 100 µl injiziert. Dazu wurde das Zellgemisch in eine bei –20 °C vorgekühlte 1 ml Spritze blasenfrei aufgesogen und mit einer 23-G-Kanüle in die rechte und linke Flanke der betäubten Mäuse injiziert. Nach dem 10. Tag wurde das Wachstum der Tumoren kontrolliert und gemessen. Es erfolgte die Einteilung der Tiere in vier Behandlungsgruppen, so dass das Gesamttumorvolumen in jeder Gruppe annähernd gleich war.

3.6.3 Kontrolle des Tumorwachstums

Am 10. Tag nach der Injektion der Tumorzellen erfolgte die erste Messung der Tumoren mit einem digitalen Messschieber. Dazu wurde eine Hautfalte gebildet, so dass der subkutan liegende Tumor etwas angehoben und gemessen werden konnte. Es wurde die Länge und die Breite des Tumors bestimmt und das Tumolvolumen berechnet: $V_{\text{Tumor}} = \frac{\text{Länge} \cdot \text{Breite}^2}{2}$. Die Größe der Tumoren sowie das Gewicht der Mäuse wurde alle fünf Tage gemessen.

3.6.4 Verabreichung der Inhibitoren

Nachdem eine Tumorgröße von etwa 100 mm³ erreicht worden war, wurden vier Versuchsgruppen mit je vier Mäusen gebildet, so dass das Gesamtvolumen der Tumoren jeder Gruppe etwa gleich war. Die Gruppen erhielten eine Monotherapie Salinomycin, eine Monothe-

rapie Sunitinib bzw. eine Kombinationstherapie aus Sunitinib und Salinomycin. Die Kontrollgruppe wurde mit der gleichen Menge Placebo behandelt. Bei zwei Reservetieren und einem überschüssig gelieferten Tier wurden je eins der Kontrollgruppe, der Sunitinibmonotherapiegruppe und der Kombinationsgruppe zugeordnet. Das Salinomycin wurde in einer Konzentration von 0,5 mg/ml in DMEM (1X)+GlutaMAX gelöst. Täglich wurden 5 mg/kg Körpergewicht mit einer 30-G-Kanüle intraperitoneal injiziert. Die Mäuse wurden durch eine Inhalation mit Isofluran betäubt. Dazu wurden sie in ein Glas gelegt. Am Deckel dieses Gefäßes war ein Tuch befestigt, das mit Isofluran getränkt war. Nach etwa 10 bis 20 Sekunden bewegten sich die Tiere nicht mehr und ihr Herzschlag verlangsamte sich. Eine zu lange Anästhesie wurde vermieden, um die Nebenwirkungen, vor allem die Depression der Atmung und des Herzkreislaufes, zu minimieren. Die Versuchstiere wurden am Nacken- und Rückenfell fixiert. Es erfolgte der Einstich in die rechte oder linke Leiste und die entsprechende Menge des Wirkstoffs wurde injiziert. Das Sunitinib wurde in einer Konzentration von 4 mg/ml in Citrat-Puffer (siehe Tabelle in Abschnitt 2.4) gelöst. Es wurden 40 mg/kg Körpergewicht oral über eine Sonde gegeben. Auch in dieser Gruppe wurden die Tiere vor der Wirkstoffverabreichung mit Isofluran betäubt, um die Gefahr einer Magenperforation zu minimieren. Durch die leichte Betäubung war der Schluckreflex noch erhalten und erleichterte das Einführen der Magensonde. Die Mäuse wurden mit dem Daumen und Zeigefinger am Nackenfell fixiert, um eine Reklination zu gewährleisten. Die Wirkstoffe oder die Placebolösungen wurden täglich für zwei Wochen verabreicht.

3.6.5 Entnahme und Einbettung der Tumoren

Nach Beendigung der Inhibitorgabe wurden die Mäuse getötet und die Tumoren entnommen. 24 Stunden nach der letzten Verabreichung der Hemmstoffe wurden die Mäuse mittels Isofluran betäubt und die Tumorgöße ein letztes Mal gemessen. Anschließend erfolgte die Mäusetötung durch zervikale Dislokation. Nach der Fixierung der Extremitäten wurde ventral das Fell über dem Abdomen eröffnet und bis zu den Flanken freipräpariert. Die subkutan liegenden Tumoren wurden vorsichtig mit einem Skalpell entfernt und in gekühltem PBS gewaschen. Jeder Tumor wurde halbiert. Eine Hälfte wurde in eine Plastikform mit O.C.T.-Medium gegeben und mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C . Die andere Hälfte wurde zur Parafineinbettung in Formaldehyd eingelegt. Die Parafineinbettung, die Anfertigung der Schnitte sowie die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. med. Gerald Assmann im pathologischen Institut Campus Großhadern durchgeführt.

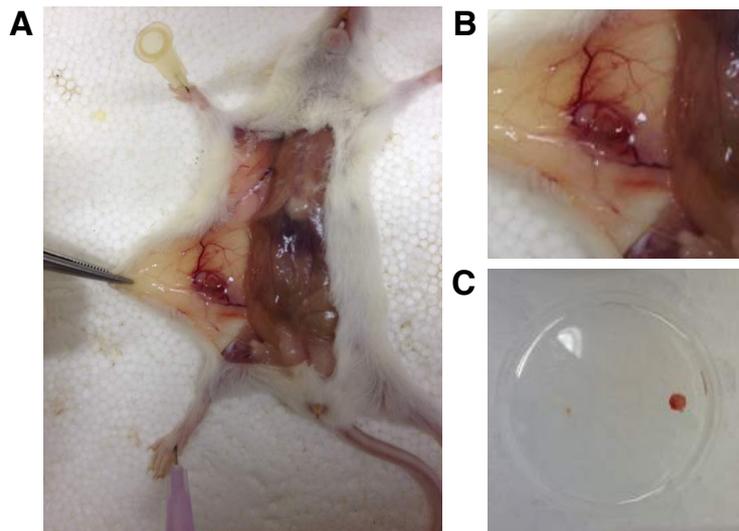


Abbildung 8: **Entnahme der Tumoren aus den Mäusen.** Es wurden 40.000 Zellen RCC-53 in die rechte und linke Flanke von NOD/SCID-Mäusen injiziert. Ab einem Tumolvolumen vom 100 mm^3 wurden Sunitinib, Salinomycin sowie Sunitinib plus Salinomycin als Kombination für 14 Tage verabreicht. Fixierung der toten Maus zur Entnahme der Tumoren (A). Präparierung des stark vaskularisierten Tumors aus dem subkutanen Gewebe der Maus (B) und sofortige Kühlung und Waschen des Tumors nach Entnahme im PBS-Eisbad (C).

3.7 Statistik

Zur Bestimmung der Überschreitungswahrscheinlichkeit wurden der t -Test, der Multiple t -Test sowie die zweifache ANOVA angewendet. Bei allen statistischen Tests erfolgte der Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe. Andernfalls wird im Text erklärt bzw. in den Grafiken explizit gekennzeichnet, zwischen welchen Gruppen der Test durchgeführt wurde.

Der Zweistichproben- t -Test für unabhängige Stichproben überprüft, ob die Mittelwerte zweier Gruppen, z.B. Gruppe A (ohne Hemmstoff) und Gruppe B (mit Hemmstoff), signifikant unterschiedlich sind. Eine Voraussetzung zur Anwendung des t -Tests ist, dass die Daten eine Gaußsche Verteilung aufweisen oder die Stichprobenumfänge müssen so groß sein, dass der zentrale Grenzwertsatz anwendbar ist. Die Aussagekraft des Tests ist abhängig von der Varianz, also dem Quadrat der Standardabweichung, dem Unterschied im Mittelwert und der Anzahl der Proben. Der *drug sensitivity assay* wurde als Triplikat durchgeführt. Alle Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt. Dabei wurden die Kontroll- und Behandlungsgruppen parallel vorbereitet und fanden simultan unter gleichen Bedingungen

statt. Daher stehen die Werte in den gleichen Reihen in Beziehung zueinander, so dass als Experimentelles Design „gepaart“ bzw. „verbunden“ gewählt wurde. Aufgrund der kleinen Anzahl an Proben (drei bis sechs Wiederholungen) und die Gaußsche Verteilung der Daten wurde der parametrische Test ausgewählt. Daher ist der verbundene *t*-Test geeignet, d.h. die absolute Differenz der verbundenen Proben ist entscheidend. Zur Berechnung des *t*'s wurden zweiseitige Tests verwendet, d.h. es wird berechnet, ob der Erwartungswert der Gruppen A und B ungleich ist. Bei einem positiven *t* ist der Mittelwert der unbehandelten Gruppe A größer als bei Gruppe B und analog ist bei einem negativen *t* der Mittelwert der Gruppe A kleiner als der Gruppe B. Es wurde ein Konfidenzintervall von 95 % gewählt. Die Kennzeichnung der Signifikanz in den Graphen ist in Tabelle 3 zu erkennen.

Beim Multiplen *t*-Test wird ein nicht verbundener Test für jede Reihe durchgeführt. Dieser Test wurde bei Experimenten mit verschiedenen Konzentrationen der Substanzen angewendet. Dabei fand ebenfalls der Vergleich zwischen einer unbehandelten Kontrollgruppe A und einer mit Wirkstoff behandelten Gruppe B statt. Durch Auswahl der Option „more power“ in GraphPad Prism wird angenommen, dass die Proben aller Reihen von der gleichen Population stammen – in unserem Fall sind es die gleichen Zelllinien – und die gleiche Standardabweichung besitzen. Auch hier wurde zur statistischen Signifikanz ein α -Wert von 0,05 gewählt.

Für die gruppierten Versuche beim *colony formation assay* wurde die zweifache ANOVA zum Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Stichproben angewendet. Zur statistischen Signifikanz wurde ein α -Wert von 0,0332 festgelegt (siehe Tabelle 3).

Kennzeichnung	Signifikanzniveau	Kennzeichnung	Signifikanzniveau
	<i>t</i> -Test, Multipler <i>t</i> -Test		zweifache ANOVA
**	p -Wert < 0.01	****	p -Wert < 0.0001
*	$0.01 < p$ -Wert < 0.05	***	$0.0001 < p$ -Wert < 0.0002
#	$0.05 < p$ -Wert < 0.075	**	$0.0002 < p$ -Wert < 0.0021
		*	$0.0021 < p$ -Wert < 0.0332

Tabelle 3: Legende zur Kennzeichnung des Signifikanzniveaus in den Grafiken

4 Ergebnisse

4.1 Anreicherung und Quantifizierung von Tumorstammzellen durch *sphere formation assay*

Durch die Methodik des *sphere formation assays* kommt es zur Ausbildung von Tumorspheres. Dabei entsteht unter serumfreien Bedingungen aus einer Tumorstammzelle eine *sphere*. Ab dem zweiten oder dritten Inkubationstag waren unter dem Lichtmikroskop *spheres* zu erkennen (siehe Abbildung 9). Tumorspheres werden durch ihre kompakte Erscheinung mit einer sichtbaren Begrenzung von Zellaggregaten unterschieden. Im Verlauf der Zeit wurde eine Zunahme der Größe der *spheres* beobachtet. Ab einem Zeitraum von einer Woche sind unter anderem sehr große *spheres* mit einem Durchmesser von bis zu 200 μm entstanden. Bei *spheres* mit einem Durchmesser von über 200 μm waren mit Nekrosen der zentralen Zellen zu rechnen, da sie nicht mehr ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden konnten. Diese Nekrosen haben sich als zentrale Verschattung der *spheres* gezeigt, wie auf den Bildern von Tag 12 und Tag 18 zu erkennen ist. Daher wurde ein Inkubationszeitraum von mehr als sieben Tagen vermieden. Aufgrund von Adhäsionskräften haben sich *spheres* bevorzugt am Rand der Vertiefungen der Mikrotiterplatten gesammelt, wie es bei dem *sphere* von Tag 18 in Abbildung 9 zu sehen ist. Diese *sphere* gehört mit einem Durchmesser von etwa 550 μm zu den größten Exemplaren. Auch nach weiterer Inkubationszeit wird der Maximaldurchmesser zwischen 500 μm und 600 μm nicht überschritten. Jedoch war nicht jede Tumorsphere in der Lage, diesen Maximaldurchmesser zu erreichen. Kleine *spheres* mit einem Durchmesser von weniger als 100 μm nahmen trotz weiterer Inkubation nicht an Größe zu. Teilweise konnte die Entstehung kleiner *spheres* erst zu einem späteren Zeitpunkt, etwa Tag 4, beobachtet werden.

Nun ergibt sich die Fragestellung, ob diese *spheres* selbst einen hohen Anteil an Tumorstammzellen besitzen. Können also mit Hilfe des *sphere formation assays* Tumorstammzellen angereichert werden? Zur Klärung dieser Frage wurde die Expression des Tumorstammzellmarkers CXCR4 ermittelt. Zum einen wurde die CXCR4-Expression auf adhärenenten Tumorzellen, zum anderen auf Zellen aus dissoziierten *spheres* quantifiziert. Es sind für die Zelllinien RCC-53 und SK-RC-17 zu erkennen gewesen, dass die aus *spheres* stammenden Tumorzellen eine höhere CXCR4-Expression aufweisen als adhärenente Tumorzellen (siehe Abbildung 10C). Dies bestätigt die Hypothese, dass in Tumorspheres ein höherer Gehalt an Tumorstammzellen vorhanden ist als bei adhärenent wachsenden Zellen.

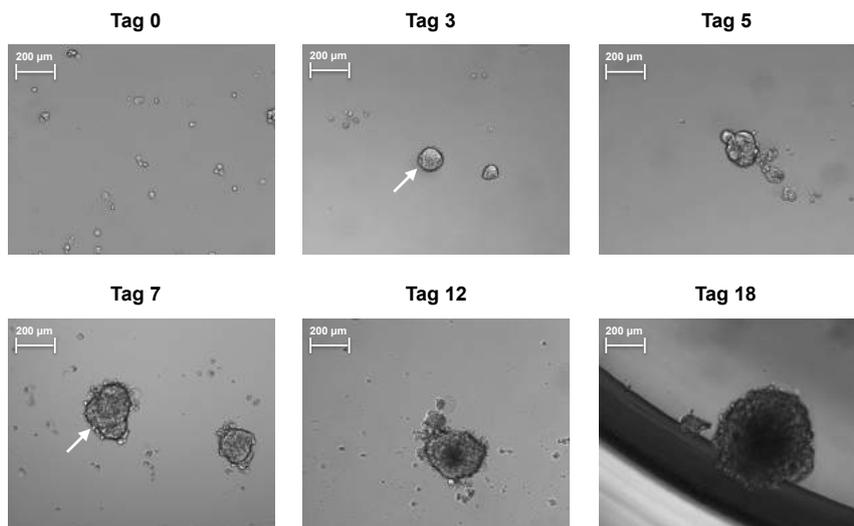


Abbildung 9: **Tumorspheres**. Es wurden von SK-RC-17 jeweils 1500 Zellen pro *well* in 12 *wells* ausgesät. Die Inkubation fand im serumfreien Tumorzellmedium in 96-*well-ultra-low-attachment*-Mikrotiterplatten für 18 Tage statt. Es wurde eine Fotodokumentation bei einer 10-fachen Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop erstellt. Typisch für Tumorspheres ist ihre kompakte Erscheinung mit einer Begrenzung (weiße Pfeile).

Die verwendeten Nierenzellkarzinomzelllinien RCC-26, RCC-53 und SK-RC-17 sind, wie in Abschnitt 2.5 beschrieben, verschiedenen Ursprungs und besitzen unterschiedliche Proliferationsraten. Zur Durchführung des *sphere formation assays* wurden alle drei Zelllinien unter serumfreien Bedingungen in *ultra-low-attachment*-Mikrotiterplatten kultiviert und anschließend die Menge der *spheres* durch Auszählen bestimmt. Weiterhin wurde zur Bestimmung der CXCR4-Expression auf den drei Zelllinien die Durchflusszytometrie angewendet. Wie in Abbildung 10A zu erkennen, sind die Zelllinien RCC-53 und SK-RC-17 in der Lage mehr *spheres* auszubilden als RCC-26. Auch ist die CXCR4-Expression in RCC-53 und SK-RC-17 höher als in RCC-26 (siehe Abbildung 10B). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Zelllinien RCC-53 und SK-RC-17 einen höheren Anteil an Tumorstammzellen aufweisen als die Zelllinie RCC-26. Der hohe Gehalt an Tumorstammzellen in RCC-53 ist mit der Zelllinienherkunft aus einem klarzelligem Nierenzellkarzinom mit aggressivem Tumorverhalten und schnellerer Progression vereinbar, während die ermittelten Eigenschaften der RCC-26 zum klarzelligem Nierenzellkarzinom mit langsamer Progression und langem rezidivfreien Intervall passen (Gassenmaier et al., 2013). Es ist anzumerken, dass teilweise starke Schwankungen in der CXCR4-Expression und in der Ausbildung von *spheres* selbst innerhalb einer Zelllinie vorkommen können.

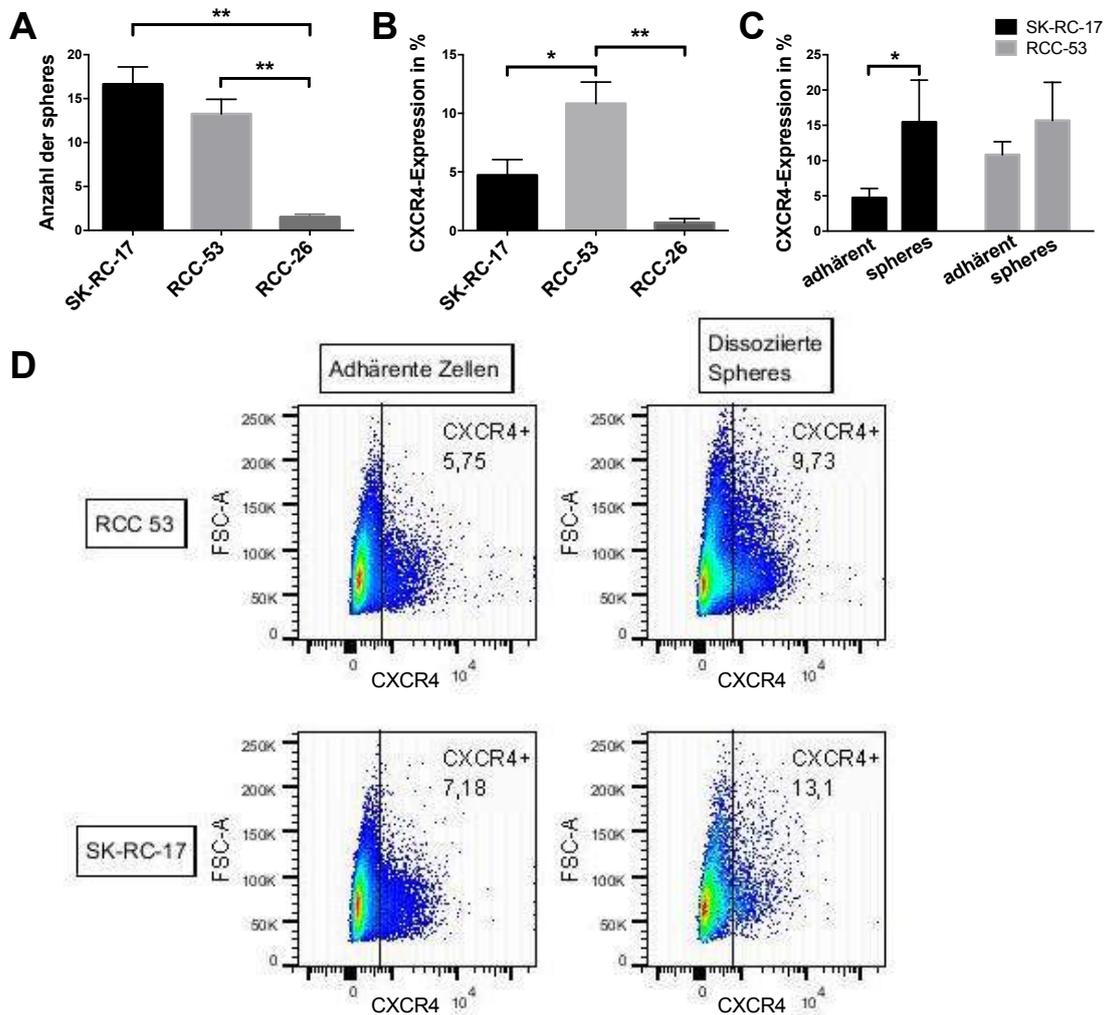


Abbildung 10: **Quantifizierung von Tumorstammzellen durch *sphere formation assay* und CXCR4-Expression.** Es wurden von SK-RC-17, RCC-53 oder RCC-26 jeweils 1500 Zellen pro *well* in 12 *wells* ausgesät. Die Inkubation fand im serumfreien Tumorzellmedium in 96-*well-ultra-low-attachment*-Mikrotiterplatten für 7 Tage statt. Anschließend wurden die *spheres* in jedem *well* ausgezählt und der Mittelwert mit SEM für jede Zelllinie aufgetragen (A). Zur Ermittlung der CXCR4-Expression wurden 500.000 Zellen jeder Zelllinie für die Durchflusszytometrie geerntet. Es wurden die Mittelwerte aus mindestens drei Wiederholungen mit SEM für jede Zelllinie dargestellt (B). Ebenso erfolgte diese Darstellung für adhärenzte Zellen und Zellen aus dissoziierten *spheres* (C). Beispielhaft wurde eine Messung der Durchflusszytometrie von adhärenzten Zellen und Zellen aus dissoziierten *spheres* von RCC-53 und SK-RC-17 dargestellt (D). Zur Prüfung der statistischen Signifikanz zwischen Kontrolle und Messung wurde der *t*-Test mit einem Signifikanzniveau $\alpha = 0.05$ angewendet. $p \leq 0.05$ *; $p \leq 0.01$ **

4.2 Bestimmung der IC₅₀-Konzentrationen für die zytotoxische Wirkung der potentiellen Tumorstammzellinhibitoren Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus

Um die Wirksamkeit der Hemmstoffe Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus gegenüber Tumorstammzellen vergleichen zu können, wurde ihre Wirkung auf die Vitalität der Nierenzellkarzinomzelllinien in einem sogenannten *cell viability assay* gemessen. Die Tumorzellen wurden mit Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden bzw. sieben Tage inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC₅₀).

Nach einer Behandlungszeit von 24 Stunden wurde bei allen Zelllinien mit steigender Konzentration der Hemmstoffe eine Abnahme der Zellvitalität beobachtet. Die Verlaufsform für jeden Wirkstoff ist bei den Zelllinien SK-RC-17, RCC-53 und RCC-26 sehr ähnlich (siehe Abbildung 11). Bei der Behandlung mit Sulforaphan ist bis zu der Konzentration 40 µM eine Abnahme der Zellvitalität zu beobachten, anschließend kommt es zu einem leichten Anstieg der Fluoreszenz, die bei allen Zelllinien vorhanden ist. Um eine Autofluoreszenz des Hemmstoffes auszuschließen, wurde ein Leerversuch ohne Tumorzellen durchgeführt. Bei steigender Sulforaphankonzentration bleibt die Fluoreszenz konstant, welche etwa dem Leerwert mit reinem Medium entspricht (siehe Abbildung 12). Die Fluoreszenz tritt demnach nur bei Vorhandensein der Tumorzellen auf. Während der Abfall des Zellüberlebens bei den Zelllinien SK-RC-17 und RCC-53 sofort beginnt, steigt die Überlebenskurve der RCC-26 bei den ersten geringeren Konzentrationen an und nimmt im Verlauf ebenfalls ab. Im Bereich der Konzentrationen von 1,25 µM und 20 µM zeigt Sulforaphan die stärkste toxische Wirkung auf die Zelllinie SK-RC-17 und die geringste Inhibition auf RCC-26.

Die Behandlung mit Salinomycin bewirkt einen fast kontinuierlichen Abfall der Zellvitalität. Hier zeigt sich eine leicht bessere Wirkung auf die Zelllinie RCC-53 im Vergleich zu RCC-26 und SK-RC-17. Durch die Inkubation mit den mTOR-Inhibitoren Temsirolimus und Everolimus kommt es zur Bildung eines Plateaus bis zu einer Wirkstoffkonzentration von 20 µM. Anschließend ist ein exponentieller Abfall der Zellvitalität zu beobachten. Es handelt sich um einen sigmoidalen Verlauf der Graphen, der hier gut zu erkennen ist und sich bei allen drei Zelllinien ähnlich zeigt. Besonders ist zu erwähnen, dass unter der Inkubation mit den Hemmstoffen Sulforaphan, Temsirolimus sowie Everolimus die Zellvitalität auf Null abfällt, während bei der Höchstkonzentration von Salinomycin bei 160 µM die Vitalität nur auf 30% bis 45% abnimmt (siehe Abbildung 11).

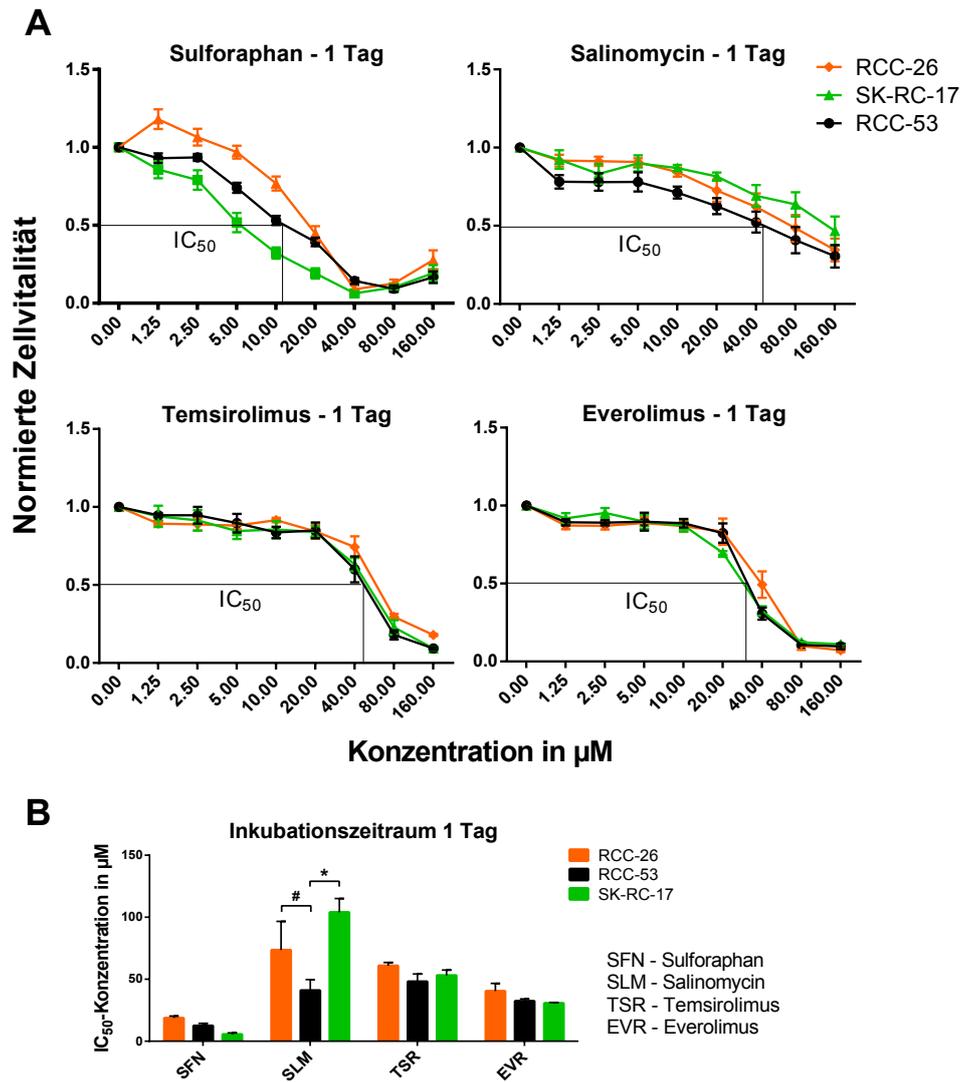


Abbildung 11: Zytotoxische Wirkung von Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus auf Tumorzellen des klarzelligen Nierenzellkarzinoms. Die Tumorzellen RCC-26, RCC-53 bzw. SK-RC-17 wurden in 96-well-Mikrotiterplatten jeweils als Triplikate ausgesät. Nach einer Erholungszeit von 24 Stunden wurde das alte Medium durch die in Tumorzellmedium verdünnten Substanzen Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus bzw. Everolimus in den Konzentrationen $0\ \mu\text{M}$ bis $160\ \mu\text{M}$ ersetzt. Die erneute Inkubation dauerte weitere 24 Stunden. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellvitalität durch den fluoreszierenden Farbstoff *CellTiter-Blue* im Fluorometer (A). Diese Versuche wurden dreimal wiederholt. Die Messwerte wurden auf den jeweiligen Kontrollwert normiert, d.h. die Zellvitalität der unbehandelten Reihe gilt als Referenz, um Schwankungen zwischen den Replikaten zu vermindern. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Ermittlung der mittleren inhibitorischen Konzentration IC_{50} für jeden Wirkstoff (gezeigt für RCC-53). Dargestellt sind die Mittelwerte der IC_{50} jeder einzelnen Messung mit Standardfehler (B). Zur Prüfung der statistischen Signifikanz zwischen den IC_{50} wurde der Multiple *t*-Test mit einem α -Wert von 0,05 verwendet. $p \leq 0.075$ #; $p \leq 0.05$ *

Die Inhibitoren wurden in DMSO aufgelöst und bei -20°C aufbewahrt. Für die Versuche wurden diese Stammlösungen mit einer Konzentration von 100 mM in den entsprechenden Endkonzentrationen in Tumorzellmedium verdünnt. Um eine zytotoxische Wirkung des DMSOs auf die Tumorzellen auszuschließen, wurden Tumorzellen in verschiedenen DMSO-Konzentrationen inkubiert (siehe Abbildung 12). Die gemessene Zellvitalität schwankt um den normierten Kontrollwert. Die Schwankung beim Zytotoxizitätsassay mit DMSO ist stärker ausgeprägt als die Schwankung der Fluoreszenz bei verschiedenen Sulforaphankonzentrationen, welches hier durch das Fehlen von Tumorzellen bedingt ist.

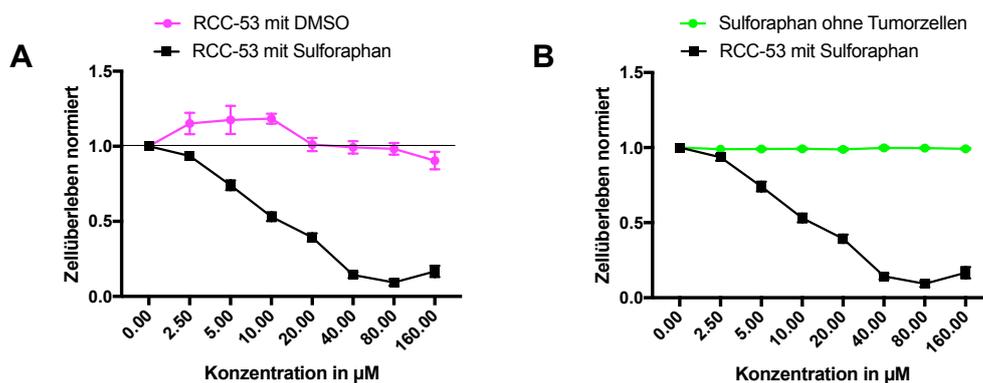


Abbildung 12: Keine toxische Wirkung von DMSO auf die Tumorzellen und keine Autofluoreszenz von Sulforaphan. Die Tumorzellen RCC-53 wurden in 96-well-Mikrotiterplatten jeweils als Triplicate ausgesät. Nach einer Erholungszeit von 24 Stunden wurde das alte Medium durch die in Tumorzellmedium verdünnten Substanzen Sulforaphan und DMSO in den Konzentrationen $0\ \mu\text{M}$ bis $160\ \mu\text{M}$ ersetzt. Die erneute Inkubation dauerte weitere 24 Stunden. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellvitalität durch den fluoreszierenden Farbstoff *CellTiter-Blue* im Fluorometer (A). Um eine Autofluoreszenz von Sulforaphan auszuschließen, wurde ein Leer-versuch ohne Tumorzellen durchgeführt. In Tumorzellmedium verdünntes Sulforaphan in den Konzentrationen $0\ \mu\text{M}$ bis $160\ \mu\text{M}$ wurde für 24 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte ebenfalls die Bestimmung der Fluoreszenz nach Zugabe des Farbstoffs *CellTiter-Blue* (B). Diese Versuche wurden dreimal wiederholt. Die Messwerte wurden auf den Kontrollwert normiert, d.h. die Zellvitalität der unbehandelten Reihe gilt als Referenz, um Schwankungen zwischen den Replikaten zu vermindern. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler.

Um den Effekt der Inhibitoren auf die RCC-Tumorzellen bei einer Langzeitbehandlung zu beobachten, wurde der Inkubationszeitraum von 24 Stunden auf sieben Tage verlängert. Es wurden keine Langzeitbehandlungen mit RCC-26 durchgeführt, da diese Zelllinie kaum *spheres* bildet und wenig CXCR4 exprimiert. RCC-26 enthält im Vergleich zu den Zelllinien RCC-53 und SK-RC-17 weniger Tumorstammzellen. Deshalb konzentrierten wir uns in den folgenden Experimenten auf RCC-53 und SK-RC-17. Wie in Abbildung 13 zu sehen, zeigen die vier verwendeten Substanzen Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus eine ähnliche Wirkung auf SK-RC-17 und RCC-53.

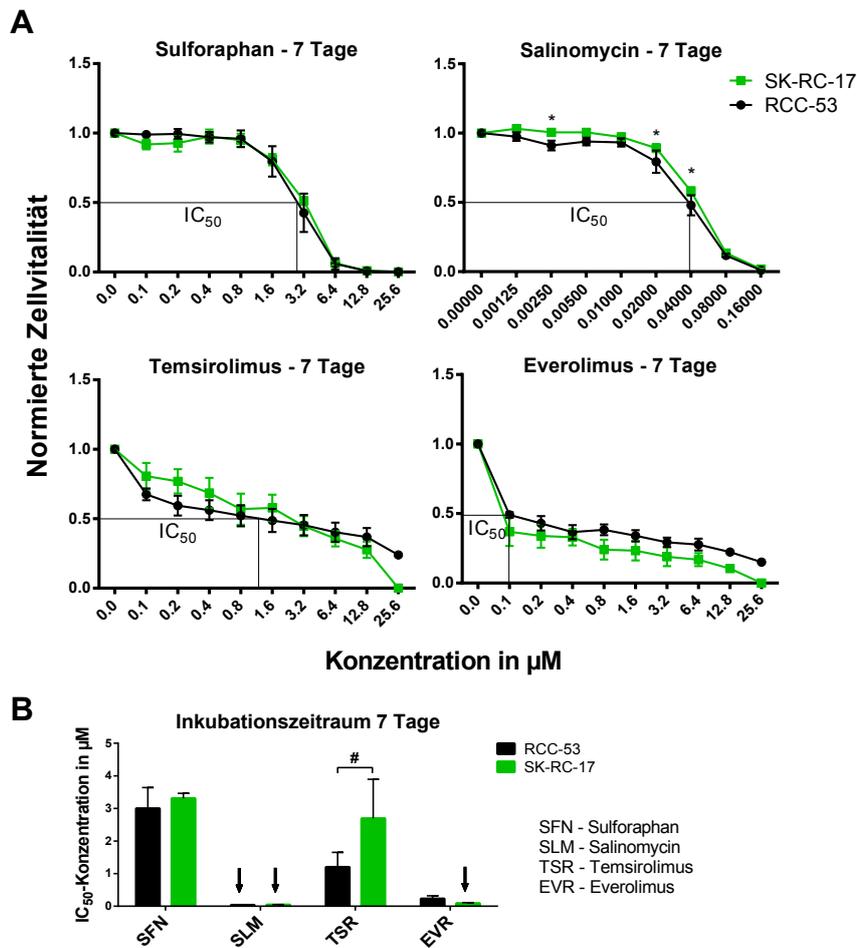


Abbildung 13: Zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen des klarzelligen Nierenzellkarzinoms durch Langzeitbehandlung mit Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus. Die Tumorzellen RCC-53 bzw. SK-Rc-17 wurden in 96-well-Mikrotiterplatten jeweils als Triplikate ausgesät. Nach einer Erholungszeit von 24 Stunden wurde das alte Medium durch die in Tumorzellmedium verdünnten Substanzen Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus bzw. Everolimus ersetzt. Der Konzentrationsbereich beträgt für Sulforaphan, Everolimus und Temsirolimus 0 μM bis 25,6 μM und für Salinomycin 0 nM bis 160 nM. Die erneute Inkubation dauerte sieben Tage. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellvitalität durch den fluoreszierenden Farbstoff *CellTiter-Blue* im Fluorometer (A). Diese Versuche wurden dreimal wiederholt. Die Messwerte wurden auf den Kontrollwert normiert, d.h. die Zellvitalität der unbehandelten Reihe gilt als Referenz, um Schwankungen zwischen den Replikaten zu vermindern. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Ermittlung der mittleren inhibitorischen Konzentration IC₅₀ für jeden Wirkstoff (gezeigt für RCC-53). Dargestellt sind die Mittelwerte der IC₅₀ jeder einzelnen Messung mit Standardfehler (B). Die Pfeile kennzeichnen die IC₅₀ unter 0,25 μM . Zur Prüfung der statistischen Signifikanz des Unterschiedes zwischen RCC-53 und SK-Rc-17 sowie zwischen den IC₅₀ wurde der Multiple *t*-Test mit einem α -Wert von 0,05 verwendet. $p \leq 0.075$ #; $p \leq 0.05$ *

Die Langzeitbehandlung mit Sulforaphan zeigt einen sigmoidalen Verlauf der Überlebenskurve, die toxische Wirkung nimmt exponentiell nach dem Plateau ab der Konzentration $0,8\ \mu\text{M}$ zu. Der Anstieg im Kurvenverlauf bei sehr hohen Konzentrationen von Sulforaphan während der Kurzzeitbehandlung ist bei den Zelllinien SK-RC-17, RCC-53 und RCC-26 zu erkennen (siehe Abbildung 11). Allerdings tritt dieses Phänomen bei den Langzeitbehandlungen über sieben Tage bei keiner der beiden Zelllinien RCC-53 und SK-RC-17 auf. Es wurden bei Salinomycin deutlich geringere Konzentrationen verwendet, da seine toxische Wirkung auf die Tumorzellen in der Langzeitbehandlung im Vergleich zu den anderen Inhibitoren stärker war. Eine inhibierende Wirkung auf die Zellaktivität zeigt sich bereits ab einer Konzentration von $0,02\ \mu\text{M}$. Während die Höchstkonzentration von $160\ \mu\text{M}$ in der Kurzzeitbehandlung lediglich zu einer Inhibition der Tumorzellvitalität auf 30% bzw. 45% führt, ist bei der Langzeitbehandlung bei einer Konzentration von $160\ \text{nM}$ die Vitalität auf 0% gesunken. Auch hier ist ein sigmoidaler Verlauf der Überlebenskurve zu beobachten. Bei den mTOR-Inhibitoren ist bei der Startkonzentration von $0,1\ \mu\text{M}$ eine deutliche Abnahme der Zellvitalität zu beobachten (siehe Abbildung 13).

Anschließend wurden die mittleren inhibitorischen Konzentrationen IC_{50} für jeden Hemmstoff bestimmt. Die mittlere inhibitorische Konzentration ist die Konzentration, bei der 50% der Zellaktivität vorhanden ist. Die IC_{50} -Konzentrationen wurden in den folgenden Versuchen verwendet, um Langzeitbehandlungen mit den Tumorzellen durchzuführen. Der Inkubationszeitraum wurde analog zur verwendeten IC_{50} -Konzentration gewählt. Zur Erhaltung der Übersichtlichkeit wurden in die Graphen der Abbildungen 11 und 13 lediglich die IC_{50} für RCC-53 eingefügt. Die Bestimmung der IC_{50} erfolgte aus den Messdaten mit Hilfe des Programms MatLab und wurden grafisch in den entsprechenden Abbildungen dargestellt. Die Werte können aus Tabelle 4 entnommen werden.

Behandlungsdauer	Zelllinie	SFN	SLM	TSR	EVR
1 Tag	RCC-26	$18,0\ \mu\text{M}$	$73,6\ \mu\text{M}$	$60,0\ \mu\text{M}$	$39,6\ \mu\text{M}$
	RCC-53	$11,6\ \mu\text{M}$	$46,4\ \mu\text{M}$	$48,0\ \mu\text{M}$	$32,0\ \mu\text{M}$
	SK-RC-17	$5,2\ \mu\text{M}$	$104,0\ \mu\text{M}$	$51,2\ \mu\text{M}$	$29,2\ \mu\text{M}$
1 Tag	RCC-53 <i>spheres</i>	$17,2\ \mu\text{M}$	$21,2\ \mu\text{M}$	$29,6\ \mu\text{M}$	$23,6\ \mu\text{M}$
	SK-RC-17 <i>spheres</i>	$7,6\ \mu\text{M}$	$28,4\ \mu\text{M}$	$75,6\ \mu\text{M}$	$24,8\ \mu\text{M}$
7 Tage	RCC-53	$2,8\ \mu\text{M}$	$0,04\ \mu\text{M}$	$1,2\ \mu\text{M}$	$0,25\ \mu\text{M}$
	SK-RC-17	$3,3\ \mu\text{M}$	$0,05\ \mu\text{M}$	$1,9\ \mu\text{M}$	$0,10\ \mu\text{M}$

Tabelle 4: Mittlere inhibitorische Konzentrationen IC_{50} für Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus bei verschiedenen Behandlungszeiten.

In der Kurzzeitinkubation von einem Tag sind die IC_{50} -Konzentrationen unter den verschie-

denen Zelllinien mit Ausnahme von Salinomycin für alle übrigen Hemmstoffe ähnlich (siehe Abbildung 11B). Zudem zeigt Salinomycin besonders hohe IC_{50} -Konzentrationen. Die IC_{50} -Konzentration bei SK-RC-17 und RCC-26 sind deutlich höher als bei RCC-53. In der Langzeitinkubation von sieben Tagen nimmt bei Salinomycin die IC_{50} besonders stark ab. Vergleicht man die IC_{50} -Konzentrationen der Langzeit- mit der Kurzzeitbehandlung genügen 1000-fach bei RCC-53 und 2000-fach geringere Dosen bei SK-RC-17, um eine Reduktion der Zellvitalität auf 50% zu erzielen (siehe Abbildung 13B). Bei SK-RC-17 nimmt die IC_{50} von 104 μ M auf 0,05 μ M und bei RCC-53 von 46,4 μ M auf 0,04 μ M ab (siehe Tabelle 4). In der Langzeitinkubation sind die IC_{50} -Konzentrationen für die Wirkstoffe Sulforaphan, Salinomycin und Everolimus in allen Zelllinien sehr ähnlich. Die IC_{50} -Konzentration von Temsirolimus ist in der Langzeitbehandlung bei der SK-RC-17 höher als bei RCC-53.

Zusammenfassend für den Zytotoxizitätsassay war die Inhibition der Zellproliferation bei allen Hemmstoffen Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus sowohl in der Kurzzeit- als auch in der Langzeitbehandlung zu beobachten. Die Hemmung der Nierenzellkarzinomzellen zeigt bei allen Zelllinien einen vergleichbaren Verlauf. Besonders hervorzuheben ist die starke Zunahme der Zytotoxizität von Salinomycin gegenüber den Tumorzellen in der Langzeit- im Vergleich zur Kurzzeitbehandlung.

4.3 Inhibition der Tumorstammzellen durch Salinomycin

Im oben beschriebenen Abschnitt konnte eine toxische Wirkung der Inhibitoren Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus auf Nierenzellkarzinomzellen nachgewiesen werden. Besitzen diese Hemmstoffe ebenfalls eine toxische Wirkung auf Tumorstammzellen und könnte man diese Inhibition als selektiv beschreiben? Durch die Anwendung des Zytotoxizitätsassays soll diese Hypothese überprüft werden. Bei einer selektiven Inhibition der Tumorstammzellen würden wir eine begrenzte Hemmung der adhärenen Nierenzellkarzinomzellen und starke Hemmung der aus *spheres* stammenden Tumorzellen erwarten.

Es wurden adhärenente sowie aus *spheres* dissoziierte Tumorzellen zur Durchführung des Zytotoxizitätstest verwendet. Da Tumorstammzellen nach Replattierung ihre Stammzeleigenschaften durch Differenzierung schnell verlieren, wurde eine kurze Inkubationszeit von 24 Stunden angestrebt. Adhärenente Tumorzellen und aus *spheres* dissoziierte Zellen wurden unter adhärenenten Bedingungen mit Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus sowie Everolimus in verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen inkubiert, um ihre zytotoxische Wirkung

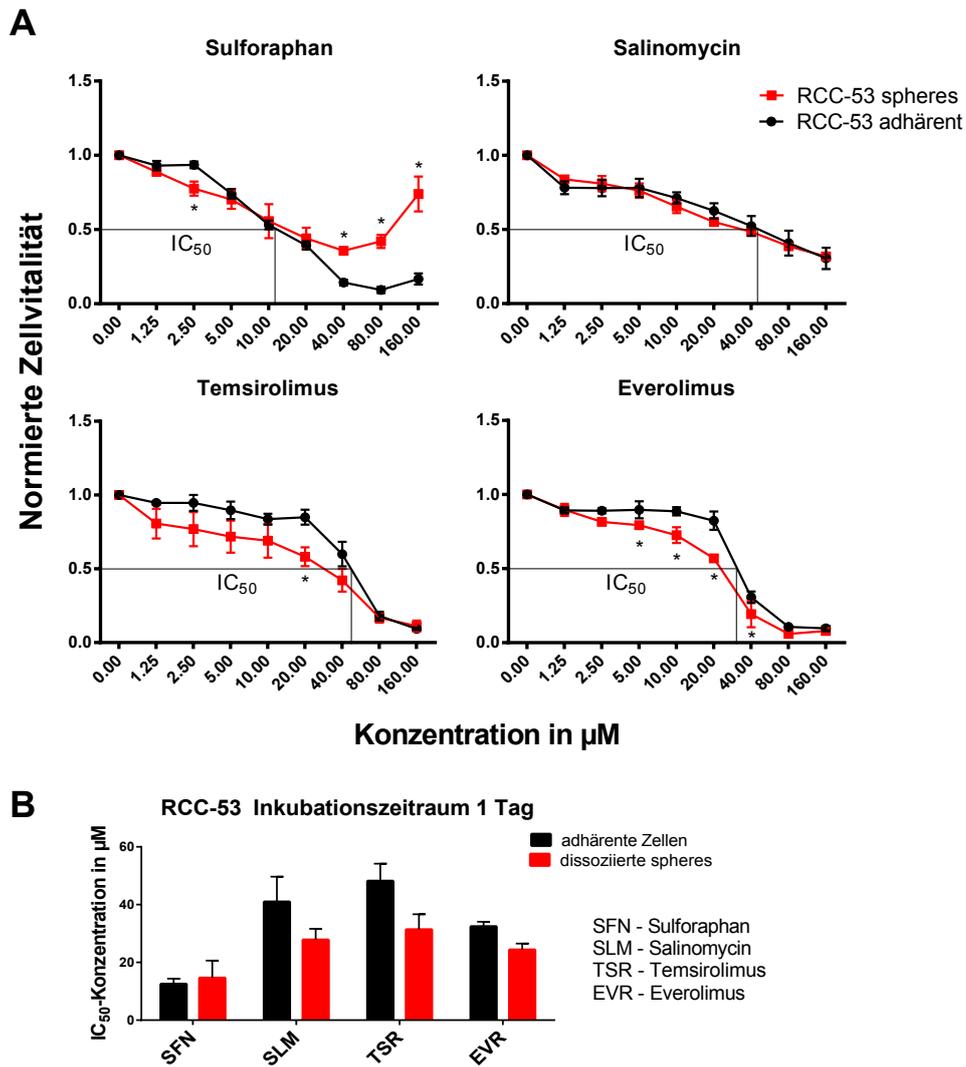


Abbildung 14: Vergleichbare zytotoxische Wirkung der Hemmstoffe auf Tumorzellen und Tumorstammzellen bei RCC-53. Nach der Anzucht von *spheres* wurden die Zellen durch proteolytische Enzyme dissoziiert. Die Zellen der dissoziierten *spheres* bzw. die Tumorzellen wurden in 96-*well*-Mikrotiterplatten als Triplikate ausgesät. Nach einer Erholungszeit von 24 Stunden wurde das alte Medium durch die in Tumorzellmedium verdünnten Inhibitoren Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus bzw. Everolimus in den Konzentrationen 0 μM bis 160 μM ersetzt. Die erneute Inkubation dauerte 24 Stunden. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellviabilität durch den fluoreszierenden Farbstoff *CellTiter-Blue* im Fluorometer. Diese Versuche wurden dreimal wiederholt. Die Messwerte wurden auf den Kontrollwert normiert, d.h. die Zellviabilität der unbehandelten Reihe gilt als Referenz, um Schwankungen zwischen den Replikaten zu vermindern. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler (A). Ermittlung der mittleren inhibitorischen Konzentration IC_{50} für jeden Wirkstoff (gezeigt für adherente Zellen). Dargestellt sind die Mittelwerte der IC_{50} jeder einzelnen Messung mit Standardfehler (B). Zur Prüfung der statistischen Signifikanz wurde der Multiple *t*-Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0.05$ angewendet. $p \leq 0.05$ *

zu vergleichen. In Abbildung 14 wurde das Überleben der Tumorzellen und der Tumorstammzellen der Zelllinie RCC-53 bei Inhibitorbehandlung für 24 Stunden dargestellt. Bis zu der Konzentration von 20 μM zeigt Sulforaphan eine ähnliche Wirkung auf adhärenente Zellen und dissoziierte *spheres*. Ab der Konzentration von 40 μM ist ein Anstieg der Vitalitätskurve, besonders bei den aus *spheres* dissoziierten Tumorzellen, zu erkennen. Bei der Behandlung mit Salinomycin zeigt sich ein fast identischer, kontinuierlicher Verlauf der Überlebenskurve der adhärenenten Zellen und der Tumorzellen der dissoziierten *spheres*. Der toxische Effekt auf die Zellen der dissoziierten *spheres* durch die Behandlung mit Temsirolimus ist etwas höher als auf die adhärenenten Zellen, bei gleicher Konzentration fällt das Zellüberleben der dissoziierten *spheres* geringer aus. Die Wirkung von Everolimus auf die Zellen der dissoziierten *spheres* ist signifikant toxischer im Vergleich zu den adhärenenten Tumorzellen bei den Konzentrationen 5 μM bis 40 μM (siehe Abbildung 14).

In Abbildung 15 wurde das Überleben der Tumorzellen und der Tumorstammzellen der Zelllinie SK-RC-17 bei einer Behandlungszeit von 24 Stunden dargestellt. Die Inkubation mit Sulforaphan zeigt bei den adhärenenten Zellen und den Zellen aus dissoziierten *spheres* einen ähnlichen Verlauf. Die toxische Wirkung von Sulforaphan auf die Tumorzellen der dissoziierten *spheres* ist bei Konzentrationen 20 μM und 40 μM geringer im Vergleich zu den adhärenenten Zellen. Auch hier ist bei Sulforaphankonzentrationen ab 40 μM der bekannte Anstieg der Fluoreszenzkurve zu erkennen. Salinomycin besitzt eine signifikant bessere Wirkung auf die Tumorzellen der dissoziierten *spheres* ab den Konzentrationen von 5 μM und höher, d.h. Salinomycin hat bei der Zelllinie SK-RC-17 einen stärkeren toxischen Effekt auf die Tumorstammzellen als auf die adhärenenten Tumorzellen. Nach einer Behandlungszeit von 24 Stunden mit den mTOR-Inhibitoren Temsirolimus und Everolimus zeigen die Zellvitalitätskurven der adhärenenten Zellen und der dissoziierten *spheres* einen ähnlichen Verlauf, ein Unterschied ist kaum zu erkennen. Auch hier stellt sich ein sigmoidaler Verlauf dar, nach einer Plateauphase bei den geringen Konzentrationen nimmt die Zellvitalität bei den Konzentrationen 20 μM und 40 μM exponentiell ab (siehe Abbildung 15).

Auch hier wurden die IC_{50} -Konzentrationen für jeden einzelnen Hemmstoff ermittelt (siehe Tabelle 4) und in den Abbildungen 14B und 15B grafisch dargestellt. Bei der Zelllinie RCC-53 sind die IC_{50} -Konzentrationen der adhärenenten Zellen und Zellen der dissoziierten *spheres* für Sulforaphan vergleichbar. Die IC_{50} -Konzentrationen der adhärenenten Tumorzellen sind für Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus höher als die IC_{50} der Tumorzellen aus dissoziierten *spheres*, jedoch handelt es sich um keinen signifikanten Unterschied. Hier weist Sulforaphan die niedrigsten und Temsirolimus die höchsten IC_{50} -Konzentrationen auf

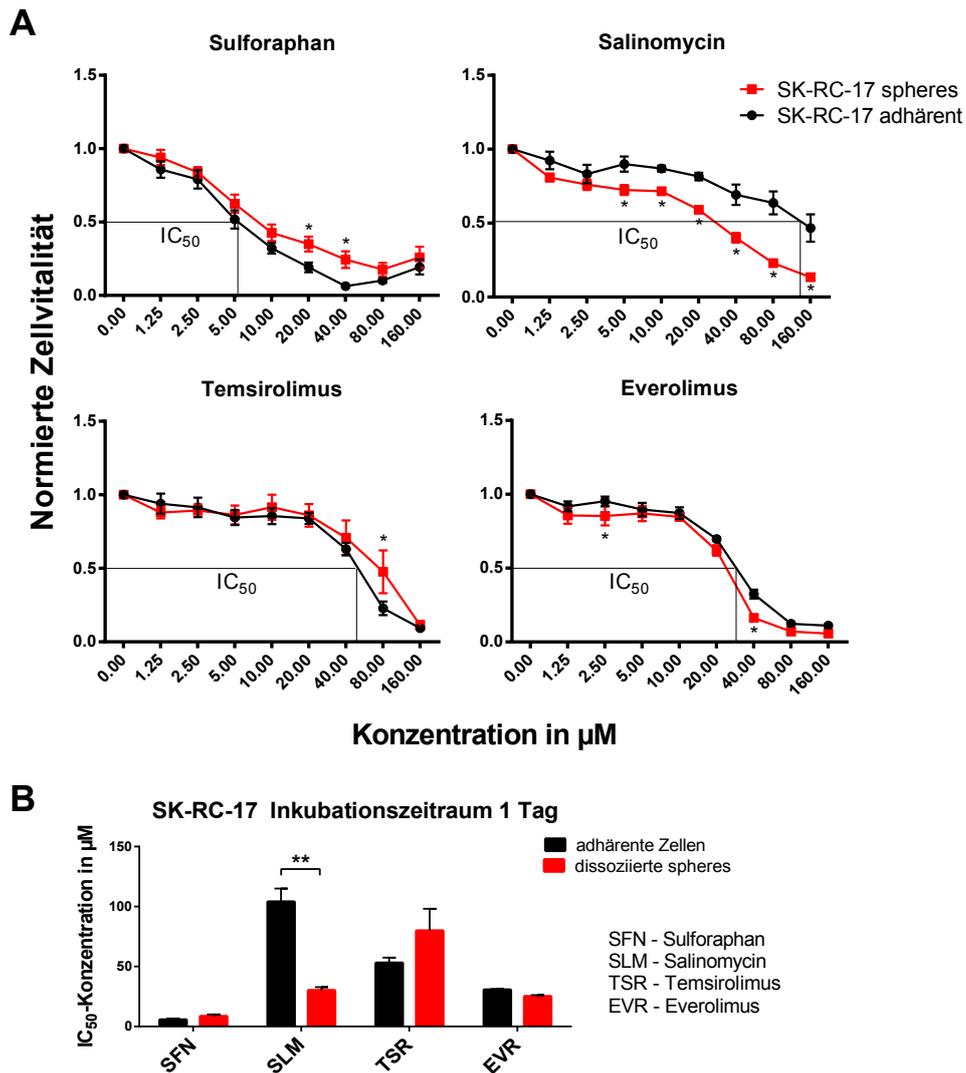


Abbildung 15: **Selektive Inhibition von Tumorstammzellen durch Salinomycin bei SK-RC-17.** Nach der Anzüchtung von *spheres* wurden die Zellen durch proteolytische Enzyme dissoziiert. Die Zellen der dissoziierten *spheres* bzw. die adhären gewachsenen Tumorzellen wurden in 96-well-Mikrotiterplatten als Triplikate ausgesät. Nach einer Erholungszeit von 24 Stunden wurde das alte Medium durch die in Tumorzellmedium verdünnten Inhibitoren Sulforaphan, Salinomycin, Temozolomide bzw. Everolimus in den Konzentrationen 0 μ M bis 160 μ M ersetzt. Die erneute Inkubation dauerte 24 Stunden. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellvitalität durch den fluoreszierenden Farbstoff *CellTiter-Blue* im Fluorometer. Diese Versuche wurden dreimal wiederholt. Die Messwerte wurden auf den Kontrollwert normiert, d.h. die Zellvitalität der unbehandelten Reihe gilt als Referenz, um Schwankungen zwischen den Replikaten zu vermindern. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler (A). Ermittlung der mittleren inhibitorischen Konzentration IC_{50} für jeden Wirkstoff (gezeigt für adhären Zellen). Dargestellt sind die Mittelwerte der IC_{50} jeder einzelnen Messung mit Standardfehler (B). Zur Prüfung der statistischen Signifikanz wurde der Multiple *t*-Test mit einem α -Wert von 0,05 verwendet. $p \leq 0.05$ *; $p \leq 0.01$ **

(siehe Abbildung 14B). Bei der Zelllinie SK-RC-17 sind die IC₅₀-Konzentrationen der adhären Zellen und Zellen der dissoziierten *spheres* bei Sulforaphan und Everolimus ebenfalls ähnlich. Bei Temsirolimus wurde sogar eine höhere IC₅₀-Konzentration zur Hemmung der Zellen der dissoziierten *spheres* benötigt. Nur bei Salinomycin ist die IC₅₀ zur Inhibition der Tumorzellen der dissoziierten *spheres* signifikant geringer als die mittlere inhibitorische Konzentration der adhären Tumorzellen (siehe Abbildung 15B).

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich wenig Unterschiede in der Hemmung zwischen adhären Tumorzellen und adhären Zellen der dissoziierten *spheres* zeigen. Eine Ausnahme stellt dabei Salinomycin bei der Zelllinie SK-RC-17 dar. Der Wirkstoff Salinomycin hemmt adhären Tumorzellen aus dissoziierten *spheres* stärker als adhären Tumorzellen. Zur Inhibition der Tumorzellen aus dissoziierten *spheres* war im Vergleich zu adhären Tumorzellen eine vierfach geringe IC₅₀-Konzentration notwendig. Nur hier konnte eine selektive Hemmung der Tumorstammzellen nachgewiesen werden.

4.4 Reduktion des Tumorstammzellanteils im RCC durch Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus

Die Inhibitoren Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus besitzen eine zytotoxische Wirkung auf Tumorstammzellen und führen zum Verlust der Stammzeleigenschaften. Diese Hypothese soll auf verschiedenen Wegen überprüft werden. Die bestimmten IC₅₀-Konzentrationen wurden verwendet, um diese mögliche Inhibition von Tumorstammzellen nachzuweisen. RCC-53 und SK-RC-17 wurden für sieben Tage mit den Inhibitoren inkubiert und anschließend der Gehalt an Tumorstammzellen in den überlebenden Zellen getestet. Dazu wurden drei unterschiedliche Tests verwendet: zum einen wurde der Anteil der Zellen bestimmt, die den RCC-Tumorstammzellmarker CXCR4 an der Zelloberfläche exprimieren, zum anderen wurden Tumorstammzellen funktionell anhand der Bildung von Tumorspheres und Zellkolonien quantifiziert.

4.4.1 Inhibition der CXCR4⁺-Zellpopulation im RCC unter Einfluss von Sulforaphan und Salinomycin

Zur Überprüfung einer möglichen Verringerung der CXCR4⁺-Zellpopulation, wurden die Zelllinien RCC-53 und SK-RC-17 zunächst unter Einfluss der Inhibitoren Sulforaphan, Sali-

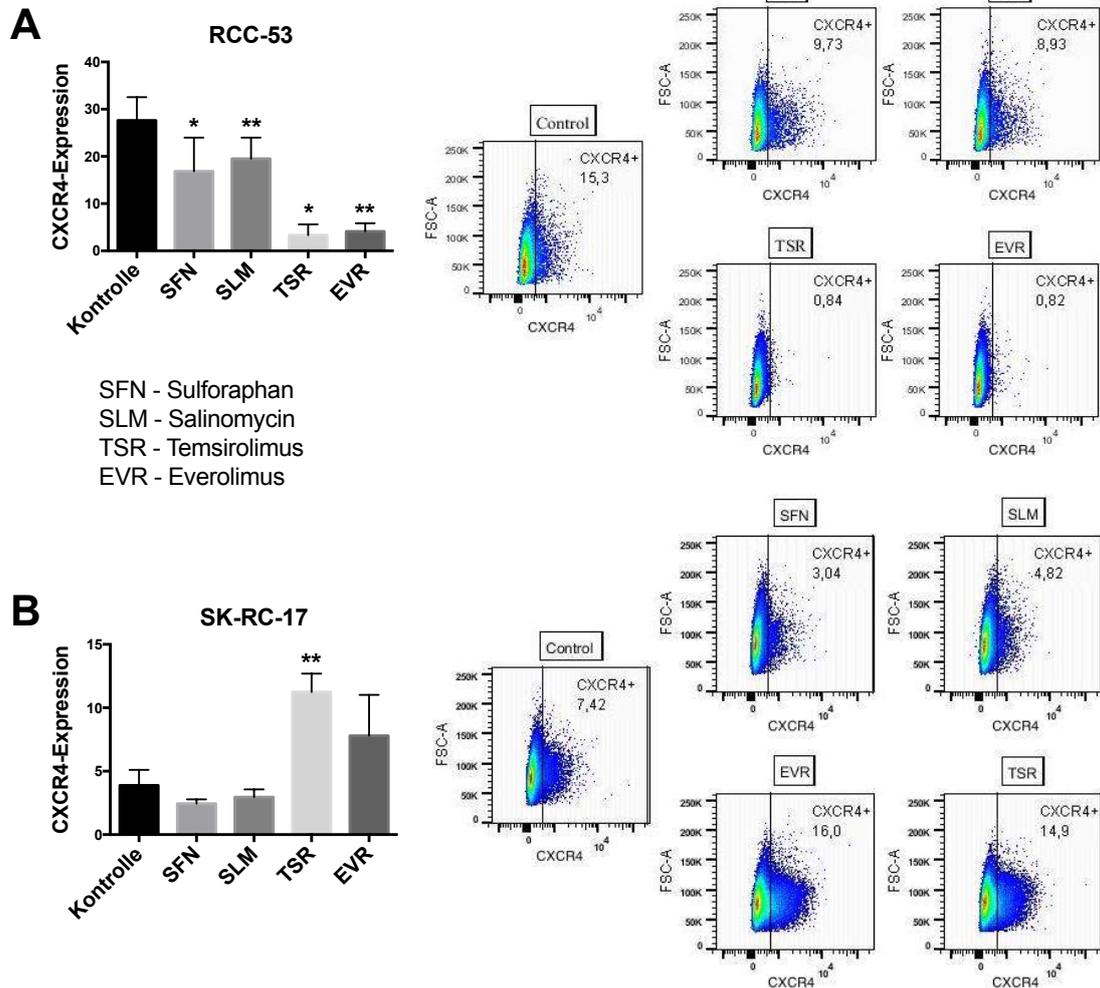


Abbildung 16: **Differenzielle Beeinflussung des Gehalts an CXCR4⁺-Zellen in RCC-Zelllinien durch Langzeitbehandlung mit Sulforaphan, Salinomycin, Everolimus und Temozolomid.** Es wurden 500.000 Zellen RCC-53 (A) bzw. SK-RC-17 (B) pro Zellkulturflasche ausgesät. Die Inkubation in der IC₅₀-Konzentration (für RCC-53 Sulforaphan: 2,8 µM; Salinomycin: 0,04 µM; Temozolomid: 1,2 µM; Everolimus: 0,25 µM; für SK-RC-17 Sulforaphan: 3,3 µM; Salinomycin: 0,05 µM; Temozolomid: 1,9 µM; Everolimus: 0,1 µM) erfolgte für 7 Tage. Anschließend wurde ein Teil der Zellen für die Durchflusszytometrie geerntet. Der restliche Teil der behandelten Zellen wurde für eine weitere Woche unter serumfreien Bedingungen in *ultra-low-attachment*-Mikrotiterplatten kultiviert. Für die Messung wurden mindestens 100.000 *Events* aufgenommen. Zur Auswertung wurde ein *Gate* mit *Event* ≤ 0,1% in der ungefärbten Probe gesetzt und auf die zu messende Probe übertragen. Dieser Versuch wurde mindestens dreimal wiederholt. Zur Prüfung der statistischen Signifikanz wurde der *t*-Test mit einem α -Wert von 0,05 verwendet. $p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **

nomycin, Temsirolimus und Everolimus für sieben Tage inkubiert. Um die Veränderung der CXCR4-Expression unter der Inhibitoreinwirkung zu quantifizieren, wurde die Durchflusszytometrie angewendet. Für die Zelllinie RCC-53 ist eine signifikante Abnahme der CXCR4⁺-Zellpopulation bei allen Substanzen zu beobachten, wobei die CXCR4⁺-Population nach der Behandlung mit Salinomycin und Everolimus besonders deutlich gesenkt wurde. Bei der Zelllinie SK-RC-17 ist eine Abnahme des Tumorstammzellmarkers lediglich nach der Behandlung mit Sulforaphan und Salinomycin zu beobachten, während die 7-tägige Inkubation mit den mTOR Inhibitoren sogar zu einer Erhöhung der CXCR4⁺-Zellen führte (siehe Abbildung 16). Sulforaphan und Salinomycin rufen also eine Inhibition der CXCR4⁺-Zellpopulation in beiden RCC-Zelllinien hervor. Die mTOR-Inhibitoren Temsirolimus und Everolimus hemmen lediglich die CXCR4⁺-Population in RCC-53. Bei SK-RC-17 ist darüber hinaus eine signifikant verstärkte CXCR4-Expression nach Temsirolimusbehandlung zu beobachten.

4.4.2 Inhibition der Ausbildung von *spheres* durch die Hemmstoffe Sulforaphan und Salinomycin

Eine weitere Eigenschaft der Tumorstammzellen ist die Ausbildung von Tumorspheres unter serumfreien, nicht-adhärennten Bedingungen. Ein hoher Gehalt an Tumorstammzellen führt zu einer Ausbildung von vielen und großen spheres. Mit dieser Methodik soll der Anteil an Tumorstammzellen unter Einfluss der Inhibitoren Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus quantifiziert werden. Die Inhibition der Tumorstammzellen wurde auf zwei Wegen getestet: zum einen wurden die RCC-Zellen nach einer Vorbehandlung mit den Hemmstoffen unter nicht-adhärennten Bedingungen kultiviert, zum anderen wurden die RCC-Zellen direkt im serumfreien Medium in *ultra-low-attachment*-Mikrotiterplatten unter Anwesenheit der Inhibitoren inkubiert.

Für die Vorbehandlung wurden die Tumorzellen für sieben Tage in der IC₅₀-Konzentration mit den Hemmstoffen inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde zur Bestimmung der CXCR4-Expression für die Durchflusszytometrie aufbereitet (siehe Abschnitt 4.4.1). Der zweite Teil der Tumorzellen wurde im serumfreien Medium in *ultra-low-attachment*-Gefäßen für weitere sieben Tage kultiviert. Die Inkubation erfolgte ohne Inhibitor. Anschließend wurde die Anzahl der gebildeten spheres bestimmt (siehe Abbildung 17A). Es wurde bei der Zelllinie RCC-53 eine Abnahme der Anzahl der gebildeten spheres für alle Hemmstoffe beobachtet. Besonders Temsirolimus führt zu einer signifikanten Hemmung der Ausbildung von spheres.

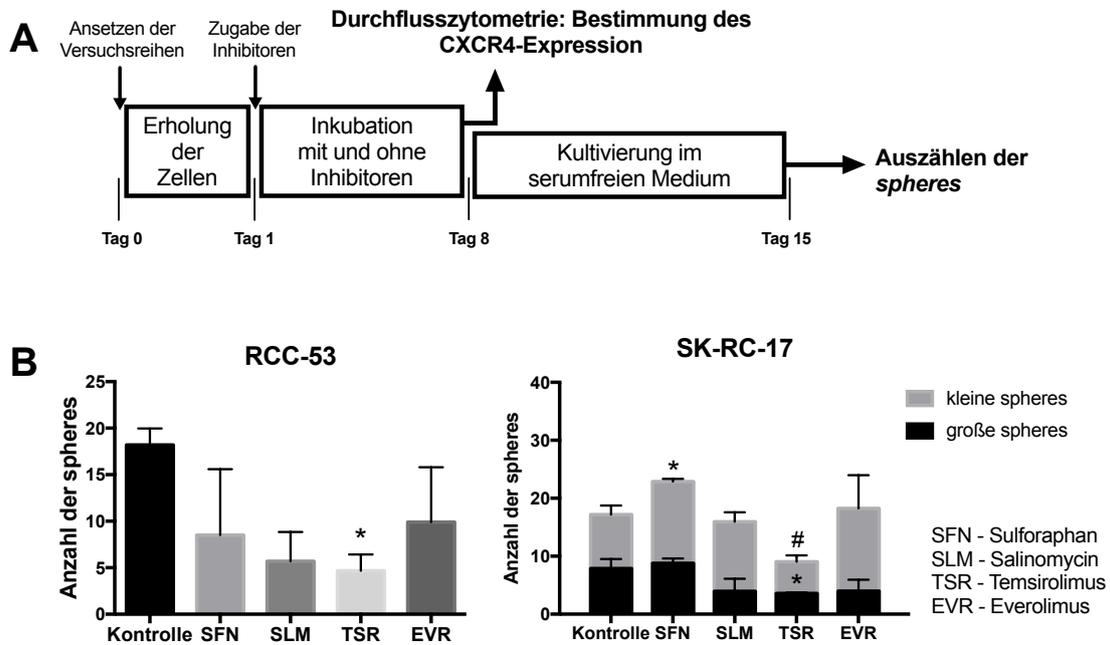


Abbildung 17: **Differentielle Beeinflussung der Ausbildung von *spheres* in RCC-Zelllinien durch Langzeitbehandlung mit Sulforaphan, Salinomycin, Everolimus und Temozolomid.** Die Durchführung des Experimentes wurde schematisch dargestellt (A). Es wurden 500.000 Tumorzellen RCC-53 oder SK-RC-17 pro Zellkulturflasche ausgesät. Die Inkubation in der IC_{50} -Konzentration (für RCC-53 Sulforaphan: $2,8 \mu\text{M}$; Salinomycin: $0,04 \mu\text{M}$; Temozolomid: $1,2 \mu\text{M}$; Everolimus: $0,25 \mu\text{M}$; für SK-RC-17 Sulforaphan: $3,3 \mu\text{M}$; Salinomycin: $0,05 \mu\text{M}$; Temozolomid: $1,9 \mu\text{M}$; Everolimus: $0,1 \mu\text{M}$) erfolgte für 7 Tage. Die vorbehandelten Tumorzellen wurden für 2 Versuche geerntet. Eine Hälfte wurde für eine Durchflusszytometrie aufbereitet und es wurde die CXCR4-Expression bestimmt. Die restlichen Zellen wurden für den *sphere formation assay* verwendet. Die Kultivierung im serumfreien Medium in 96-*well-ultra-low-attachment*-Mikrotiterplatten fand ohne Inhibitor für weitere 7 Tage statt. Anschließend wurden die *spheres* pro *well* ausgezählt und der Mittelwert errechnet (B). Bei SK-RC-17 erfolgte eine Unterscheidung zwischen kleinen und großen *spheres* bei einer Durchmessergränze von $100 \mu\text{m}$. Dieser Versuch wurde mindestens dreimal wiederholt und die Mittelwerte der Wiederholungen wurden grafisch mit SEM dargestellt (C). Zur Prüfung der statistischen Signifikanz wurde der Multiple *t*-Test mit einem α -Wert von 0,05 verwendet. $p \leq 0,075$ #; $p \leq 0,05$ *

Während *spheres* der RCC-53 eine vergleichbare Größe aufweisen, bildeten die Zellen der SK-RC-17 *spheres* in verschiedenen Größen. Es erfolgte eine Unterscheidung zwischen großen und kleinen *spheres*, dabei wurde die Grenze von 100 μm für den Durchmesser der *spheres* festgelegt. Es gab keine Mindestgröße. Solange ein kleiner Tumorsphere die typische kompakte Erscheinung mit einer Begrenzung besaß, und sich damit von Zellaggregaten unterschied, wurde er als kleines *sphere* kategorisiert. Mit Ausnahme von Sulforaphan verminderte sich bei SK-RC-17 für die Hemmstoffe die Anzahl der großen *spheres* mit einem Durchmesser über 100 μm . Für Temsirolimus fand ebenfalls eine Abnahme der Anzahl der kleinen *spheres* mit einem Durchmesser weniger als 100 μm statt. Bei Temsirolimus wurde also die absolute Anzahl der *spheres* verringert. Für Salinomycin und Everolimus ist bei diesem Versuch anzunehmen, dass die Vorbehandlung wenig Einfluss auf die Entstehung der *spheres* hat. Die Gesamtzahl der *spheres* bleibt konstant, jedoch wird das Wachstum inhibiert und die *spheres* fallen kleiner aus. Nach der Behandlung mit Sulforaphan stieg die Anzahl der kleinen *spheres* sogar an. In diesem Versuch zeigte sich für die Langzeitvorbehandlung mit Sulforaphan weder eine Inhibition der Entstehung noch des Wachstums der *spheres* (siehe Abbildung 17B).

Im Vergleich zum oben beschriebenen Versuch wurden die Tumorzellen nicht mit den Inhibitoren vorbehandelt. Die Inkubation mit Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus erfolgte direkt im serumfreien Medium in *ultra-low-attachment*-Mikrotiterplatten. Dabei wurde als geringste Konzentration die einfache IC_{50} und als höchste Konzentration die achtfache IC_{50} verwendet. Nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen wurden die *spheres* unter einem Lichtmikroskop ausgezählt (siehe Abbildung 18A).

Bei der Behandlung von SK-RC-17 mit Salinomycin führt die steigende Substanzkonzentration zu einer kontinuierlichen Senkung der Anzahl von *spheres* mit einem Durchmesser größer oder gleich 100 μm . Bei der achtfachen IC_{50} -Konzentration von Salinomycin wird signifikant keine Entstehung von großen *spheres* mehr beobachtet und auch die Anzahl der *spheres* mit kleinem Durchmesser nahm hier im Vergleich zur Kontrolle ab, während die Menge der *spheres* kleiner als 100 μm bis zu der Konzentration der vierfachen IC_{50} zunimmt. Es ist anzunehmen, dass die Wirkung von Salinomycin in den Konzentrationen ein-, zwei- und vierfachen IC_{50} nur zu einer Hemmung des *Spherewachstums* führt. Die Gesamtmenge der *spheres* ändert sich hier nur geringfügig, jedoch nehmen die *spheres* an Größe ab. Sulforaphan zeigt auf die Entstehung der großen *spheres* eine ähnliche Wirkung wie Salinomycin, mit steigender Konzentration nimmt die Anzahl der großen *spheres* ab. Jedoch führt die Sulforaphanbehandlung auch bei den *spheres* mit einem Durchmes-

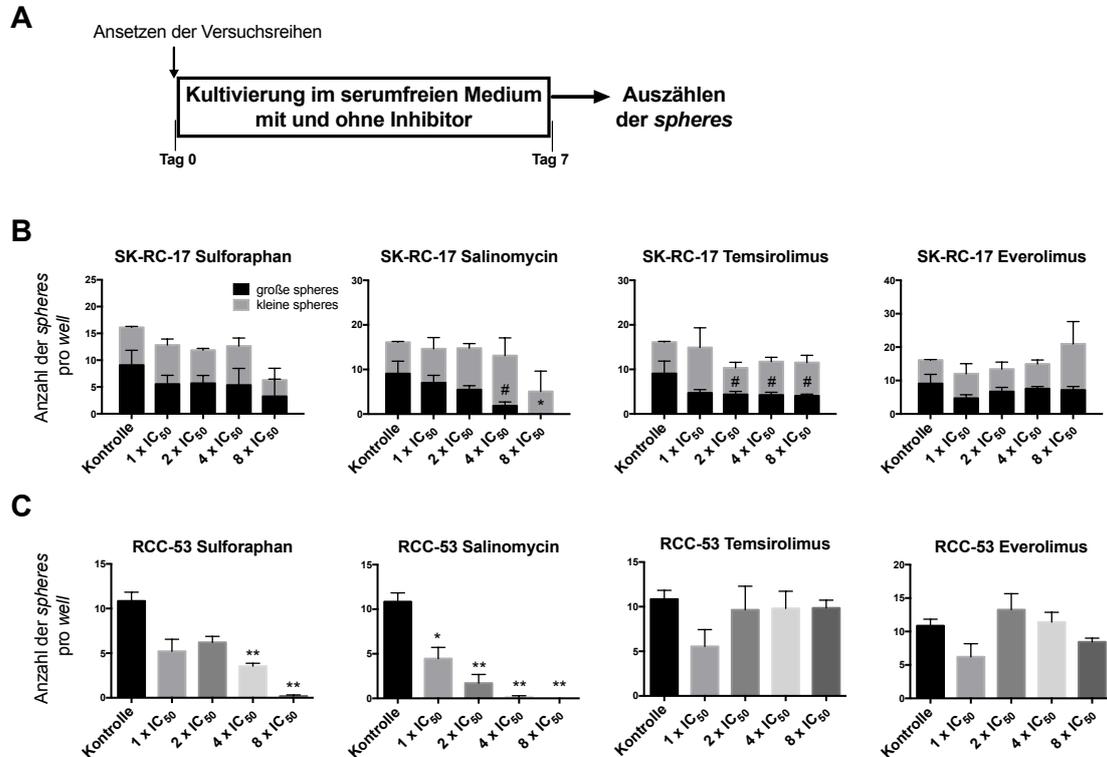


Abbildung 18: Inhibition des Spherewachstums durch Sulforaphan und Salinomycin. Die Durchführung des Experimentes wurde schematisch dargestellt (A). Die Tumorzellen RCC-53 bzw. SK-RC-17 wurden unter serumfreien Bedingungen in *ultra-low-attachment*-Mikrotiterplatten inkubiert. Die Kultivierung erfolgte als Hexaplikate ohne Inhibitor als Kontrolle und mit Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus in der ein-, zwei-, vier- und achtfachen IC₅₀-Konzentration (für RCC-53 Sulforaphan: 2,8 µM; Salinomycin: 0,04 µM; Temsirolimus: 1,2 µM; Everolimus: 0,25 µM; für SK-RC-17 Sulforaphan: 3,3 µM; Salinomycin: 0,05 µM; Temsirolimus: 1,9 µM; Everolimus: 0,1 µM). Nach einer Behandlungszeit von sieben Tagen wurden die *spher'es* anschließend ausgezählt und der Mittelwert pro *well* berechnet. Hierbei erfolgte für SK-RC-17 eine Unterscheidung zwischen großen *spher'es* mit einem Durchmesser größer als 100 µm und kleinen *spher'es* mit einem Durchmesser kleiner als 100 µm. Dieser Versuch wurde mindestens dreimal wiederholt. Die Mittelwerte der Versuche wurden grafisch mit SEM dargestellt. Zur Prüfung der statistischen Signifikanz wurde der Multiple *t*-Test mit einem α -Wert von 0,05 verwendet. $p \leq 0.075$ #; $p \leq 0.05$ *; $p \leq 0.01$ **

ser kleiner $100\ \mu\text{m}$ zu einer Senkung der Anzahl. Bei der achtfachen IC_{50} -Konzentration von Sulforaphan halbiert sich die Anzahl der großen und kleinen *spheres*. Temsirolimus führt bei allen Konzentrationen zu einer Senkung der Anzahl der großen *spheres* bei SK-RC-17. Durch die Anwesenheit dieses mTOR-Inhibitors halbiert sich die Anzahl der *spheres* mit einem Durchmesser größer oder gleich $100\ \mu\text{m}$. Mit Steigerung der Konzentration von der einfachen auf die achtfache IC_{50} sinkt ebenfalls die Gesamtzahl der *spheres*. Temsirolimus führt also zu einer Inhibition der Entstehung und des Wachstums von *spheres*. Durch die Behandlung mit Everolimus sinkt die Anzahl der großen *spheres* in SK-RC-17 nur minimal. Insgesamt ist davon auszugehen, dass Everolimus kaum einen Einfluss auf die Ausbildung von *spheres* ausübt (siehe Abbildung 18B).

Die Behandlung der Zelllinie RCC-53 mit Sulforaphan und Salinomycin ergab eine Abnahme der Anzahl der *spheres* bei steigender Konzentration der Inhibitoren. Hier erfolgte im Gegensatz zum Versuch mit SK-RC-17 keine Kategorisierung in große und kleine *spheres*, da sie sich in ihrer Größe kaum unterschieden. Unter Einfluss von Sulforaphan in ein- bis zweifacher IC_{50} halbiert sich die Anzahl der *spheres*. Höhere Konzentrationen führen zu einer signifikanten Abnahme der *spheres* bis bei der achtfachen IC_{50} -Konzentration sich kaum noch *spheres* ausbildeten. Die Wirkung von Salinomycin auf die Ausbildung von *spheres* zeigt bereits bei der zweifachen IC_{50} eine signifikante Inhibition der Ausbildung von *spheres*, während bei der Höchstkonzentration der achtfachen IC_{50} keine Ausbildung von *spheres* mehr beobachtet werden konnte. Unter Einwirkung der mTOR-Inhibitoren Temsirolimus und Everolimus waren bei einfacher IC_{50} -Konzentration ein Rückgang der *spheres* zu erkennen. Durch die fehlende Signifikanz, kann man jedoch davon ausgehen, dass die mTOR-Inhibitoren zu keiner Hemmung der Ausbildung von *spheres* führen (siehe Abbildung 18C).

Die Wirkung der Inhibitoren auf die *Sphere*ausbildung wird wie folgt beurteilt: Vorbehandlungen mit den Hemmstoffen führen bei RCC-53 zu einer Abnahme der *Sphere*anzahl. Bei SK-RC-17 wird unter Einwirkung von Temsirolimus eine signifikante Abnahme der Anzahl der *spheres* beobachtet. Die Vorbehandlung mit Salinomycin führt lediglich zu einer nicht-signifikanten Reduktion des *Sphere*-wachstums. Langzeitinkubationen mit Sulforaphan und Salinomycin führen bei beiden Zelllinien mit steigender Konzentration zu einer Verminderung der *Sphere*anzahl und zu einer Reduktion des *Sphere*wachstums. Bei Temsirolimus und Everolimus war in der Langzeitinkubation dagegen kaum eine Inhibition der Ausbildung von *spheres* zu beobachten.

4.4.3 Inhibition der Ausbildung von Holoklonen unter dem Einfluss von Sulforaphan und Salinomycin

Tumorstammzellen sind in der Lage Zellkolonien zu bilden. Da ein positiver Zusammenhang zwischen Stammzellgehalt und Koloniebildungsvermögen besteht, wird die Hypothese aufgestellt, dass die Inhibitoren Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus zu einer Hemmung der Ausbildung von Zellkolonien führen. Um die Sensitivität der koloniebildenden Zellen gegenüber den Inhibitoren zu überprüfen, wurde der *colony formation assay* angewendet. Dünn ausgesäte Tumorzellen wurden für sieben Tage mit den Hemmstoffen in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert und anschließend die Anzahl der Zellkolonien erfasst. Die Kolonisationseffizienz definiert das Verhältnis des Anteils der Tumorzellen, die in der Lage waren, eine Zellkolonie zu formen, zu der Gesamtzahl der ausgesäten Zellen. Aus Abbildung 19A kann für RCC-53 und SK-RC-17 die durchschnittliche Zellkoloniezahl der unbehandelten Gruppe entnommen werden. Damit ergibt sich für RCC-53 eine Kolonisationseffizienz von 12,7 % und für SK-RC-17 eine Kolonisationseffizienz von 8 %.

Durch die Behandlung mit Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus wurde die Kolonisationseffizienz von RCC-53 und SK-RC-17 signifikant gesenkt (siehe Abbildung 19A). Es wurde eine Hemmung der Ausbildung von Zellkolonien beobachtet. Bei steigender Konzentration auf die halbe und einfache IC_{50} nimmt die Gesamtzahl der Zellkolonien signifikant ab. In der Abbildung 19B lässt sich durch die Färbung mit Methylenblau bereits makroskopisch eine Abnahme der Zellkoloniedichte mit steigender Inhibitorkonzentration erkennen.

Zellkolonien kann man in verschiedene Typen differenzieren: Holo-, Mero- und Paraklone. Insbesondere die Holoklone enthalten einen hohen Anteil an Tumorstammzellen, während Mero- und Paraklone einen höheren Gehalt an ausdifferenzierten Tumorzellen besitzen (Barrandon and Green, 1987). Unter dem Lichtmikroskop sind bei einer zehnfachen Vergrößerung die verschiedenen Zellkolonietypen Holo-, Mero- und Paraklone zu identifizieren (siehe Abbildung 20). Während die kompakten Holoklone eine hohe Zelldichte aufweisen, sind die Paraklone durch ein diffuses Vorkommen der Tumorzellen charakterisiert. Weiterhin unterscheiden sich die Zellkolonietypen in der Begrenzung. Besonders bei der Zelllinie SK-RC-17 sind die Holoklone durch eine genaue Begrenzung zu erkennen. Im Gegensatz dazu zeigen die Paraklone eine diffuse Abgrenzung der Zellkolonie. Bei den Meroklonen handelt es sich um eine Mischform die sowohl Eigenschaften der Holoklone als auch der Paraklone besitzen.

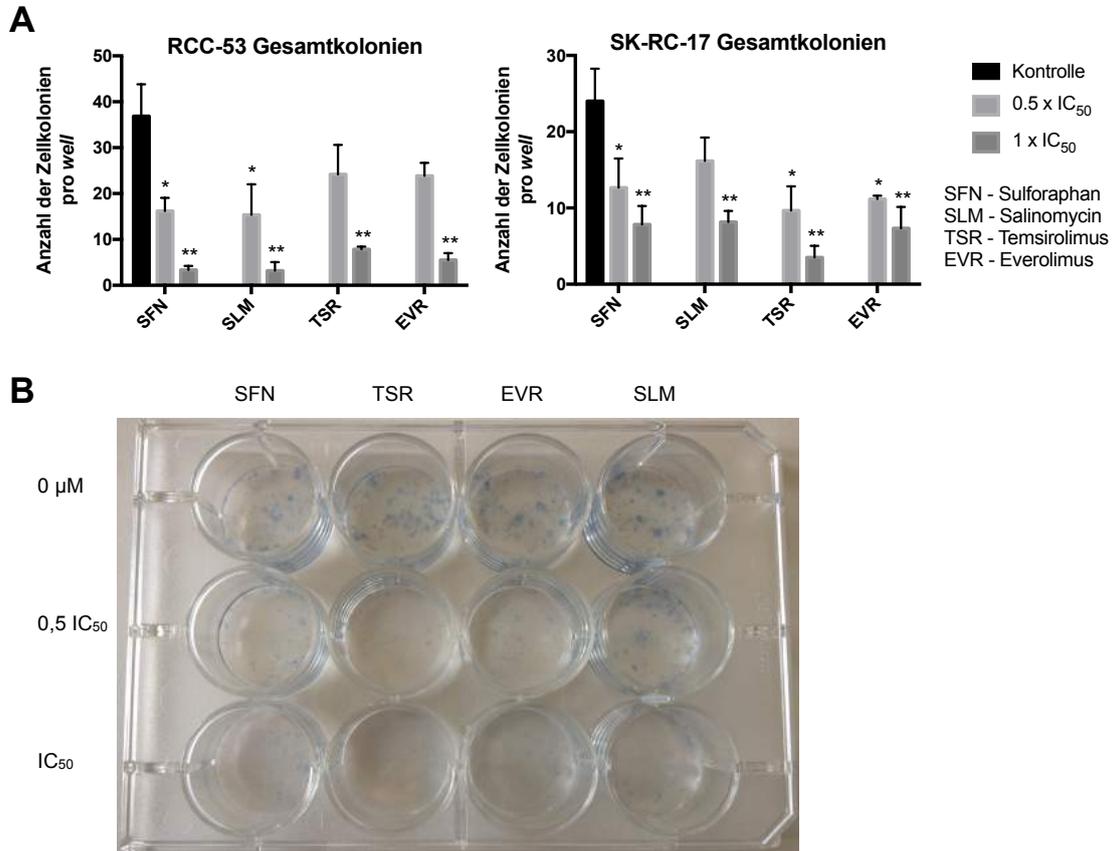


Abbildung 19: Inhibition der Ausbildung von Zellkolonien durch Sulforaphan, Salinomycin, Temozolomid und Everolimus. Dargestellt ist die Gesamtzahl der Zellkolonien unter Einfluss der Hemmstoffe für RCC-53 und SK-RC-17 (A). Es wurden 300 Zellen pro Vertiefung in 12-well-Mikrotiterplatten ausgesät. Die Substanzen Sulforaphan, Salinomycin, Temozolomid und Everolimus wurden in den Konzentrationen halbe und einfache IC₅₀ (für RCC-53 Sulforaphan: 2,8 μM; Salinomycin: 0,04 μM; Temozolomid: 1,2 μM; Everolimus: 0,25 μM; für SK-RC-17 Sulforaphan: 3,3 μM; Salinomycin: 0,05 μM; Temozolomid: 1,9 μM; Everolimus: 0,1 μM) verwendet. Nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen wurden die entstandenen Zellkolonien mit Methyleneblau gefärbt und fixiert (B). Anschließend erfolgte eine Auszählung der Zellkolonien unter dem Lichtmikroskop und die grafische Darstellung der Mittelwerte mit SEM. Zur Prüfung der statistischen Signifikanz wurde der Multiple *t*-Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0.05$ angewendet. $p \leq 0.05$ *; $p \leq 0.01$ **

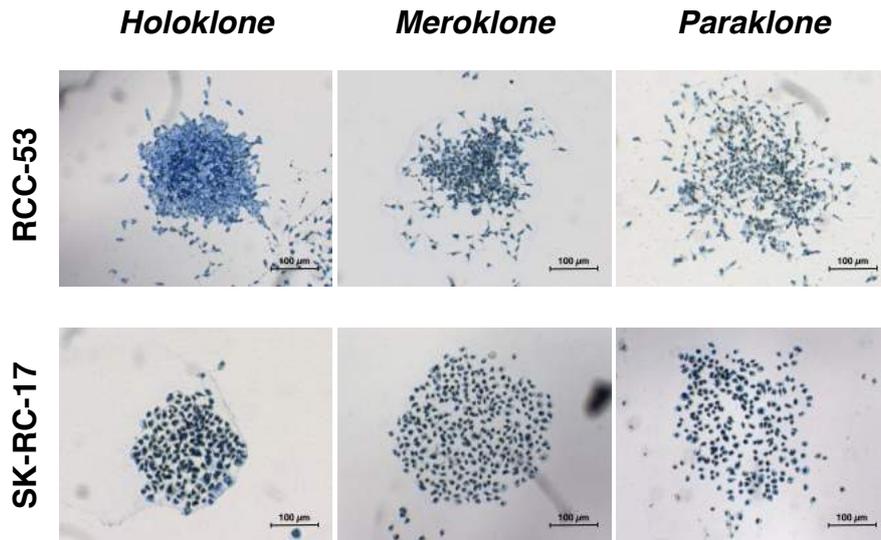


Abbildung 20: **Zellkolonietypen.** Es wurden 300 Zellen pro Vertiefung in 12-*well*-Mikrotiterplatten ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen wurden die entstandenen Zellkolonien mit Methylblau gefärbt und fixiert. Bei einer 10-fachen Vergrößerung unter Lichtmikroskop erfolgte die Fotodokumentation.

Die separate Darstellung der Zellkolonietypen in Abbildung 21 lässt eine Verminderung jedes einzelnen Zellkolonietypes erkennen. Sowohl für RCC-53 als auch für SK-RC-17 nimmt jede Fraktion mit steigender Konzentration der Wirkstoffe ab. Die Behandlung der Zelllinie SK-RC-17 mit Sulforaphan und Salinomycin zeigt bei einfacher IC_{50} -Konzentration sogar eine komplette Inhibition des Zellkolonietypes Holoklon, d.h. bei dieser Konzentration wurde keine Ausbildung von Holoklonen beobachtet.

Unter den drei Zellkolonietypen kommen Holoklone mit einem Anteil von 18 % bei RCC-53 und 8 % bei SK-RC-17 am seltensten vor. Die Paraklone kommen als häufigster Zellkolonietyp vor, 54 % bei RCC-53 und 70 % bei SK-RC-17 (siehe Abbildung 22). Bei einer selektiven Inhibition der Tumorstammzellen würden die Inhibitoren vorrangig zu einer Abnahme des Anteils an Holo- und Meroklonen führen. Zur Beurteilung der Veränderungen der relativen Anteile einzelner Zellkolonietypen wurden diese im Verhältnis zur Gesamtzellkoloniezahl in den Abbildungen 22A und C dargestellt. Die Abbildungen 22B und D zeigen die Mittelwerte der relativen Anteile der Zellkolonietypen auf den Mittelwert der Kontrolle normiert.

Die Behandlung mit Sulforaphan führt bei RCC-53 zu einer Steigerung des Anteils der Holoklone, während die Mero- und Paraklone abnehmen. Im Gegensatz zur Behandlung mit Sulforaphan zeigt sich unter Anwesenheit von Salinomycin eine Zunahme des Anteils der

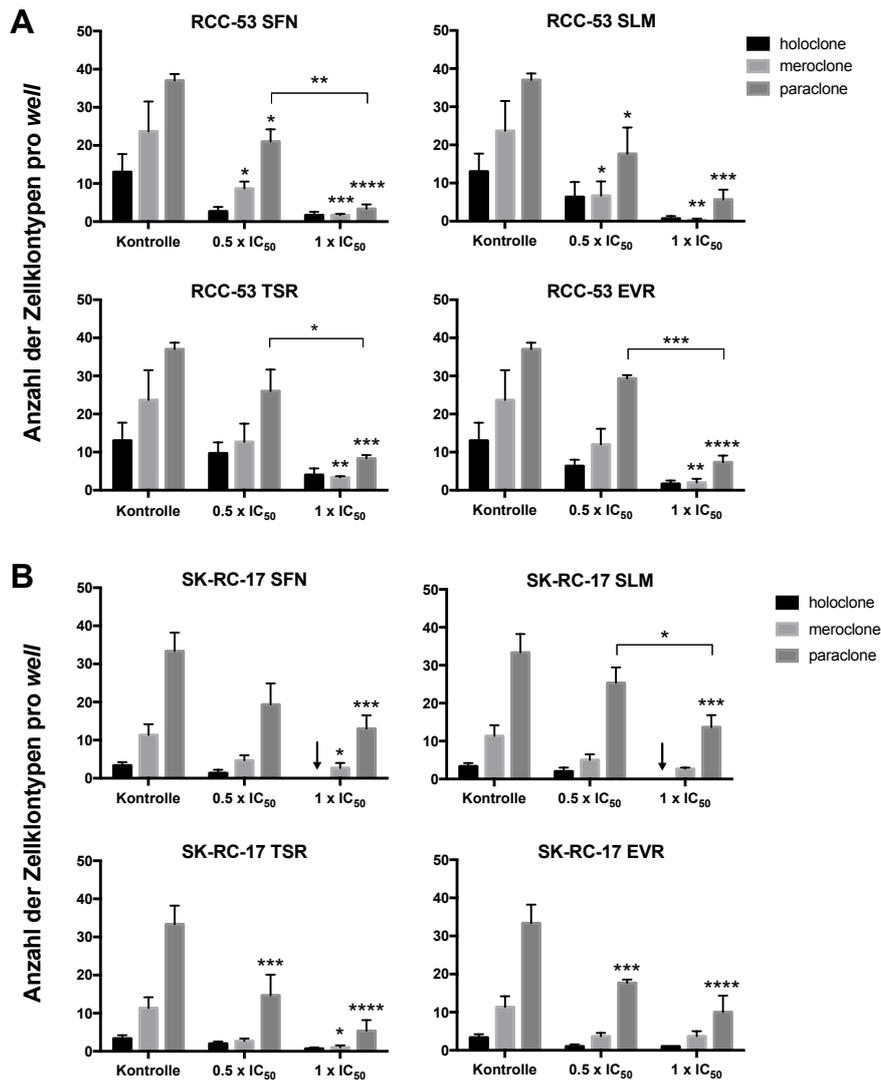


Abbildung 21: Inhibition der Ausbildung der Zellkolonietypen durch Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus. Es wurden 300 Zellen RCC-53 oder SK-RC-17 in 12-well-Mikrotiterplatten ausgesät. Die Substanzen Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus wurden in den Konzentrationen halbe und einfache IC₅₀ (für RCC-53 Sulforaphan: 2,8 µM; Salinomycin: 0,04 µM; Temsirolimus: 1,2 µM; Everolimus: 0,25 µM; für SK-RC-17 Sulforaphan: 3,3 µM; Salinomycin: 0,05 µM; Temsirolimus: 1,9 µM; Everolimus: 0,1 µM) verwendet. Nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen wurden die entstandenen Zellkolonien mit Methylenblau gefärbt und fixiert. Anschließend erfolgte eine Unterscheidung zwischen den Zellkolonietypen Holo-, Mero-, und Paraklone und die Auszählung der Zellkolonien unter dem Lichtmikroskop. Die Pfeile kennzeichnen den Abfall der Anzahl von Holoklonen auf Null. Dieser Versuch wurde mindestens dreimal wiederholt. Es wurde der Mittelwert der absoluten Anzahl der einzelnen Zellkolonietypen grafisch mit SEM dargestellt. Zur Prüfung der statistischen Signifikanz wurde die zweifache ANOVA mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0.03$ angewendet. $p \leq 0.0332$ *; $p \leq 0.0021$ **; $p \leq 0.0002$ ***; $p \leq 0.0001$ ****

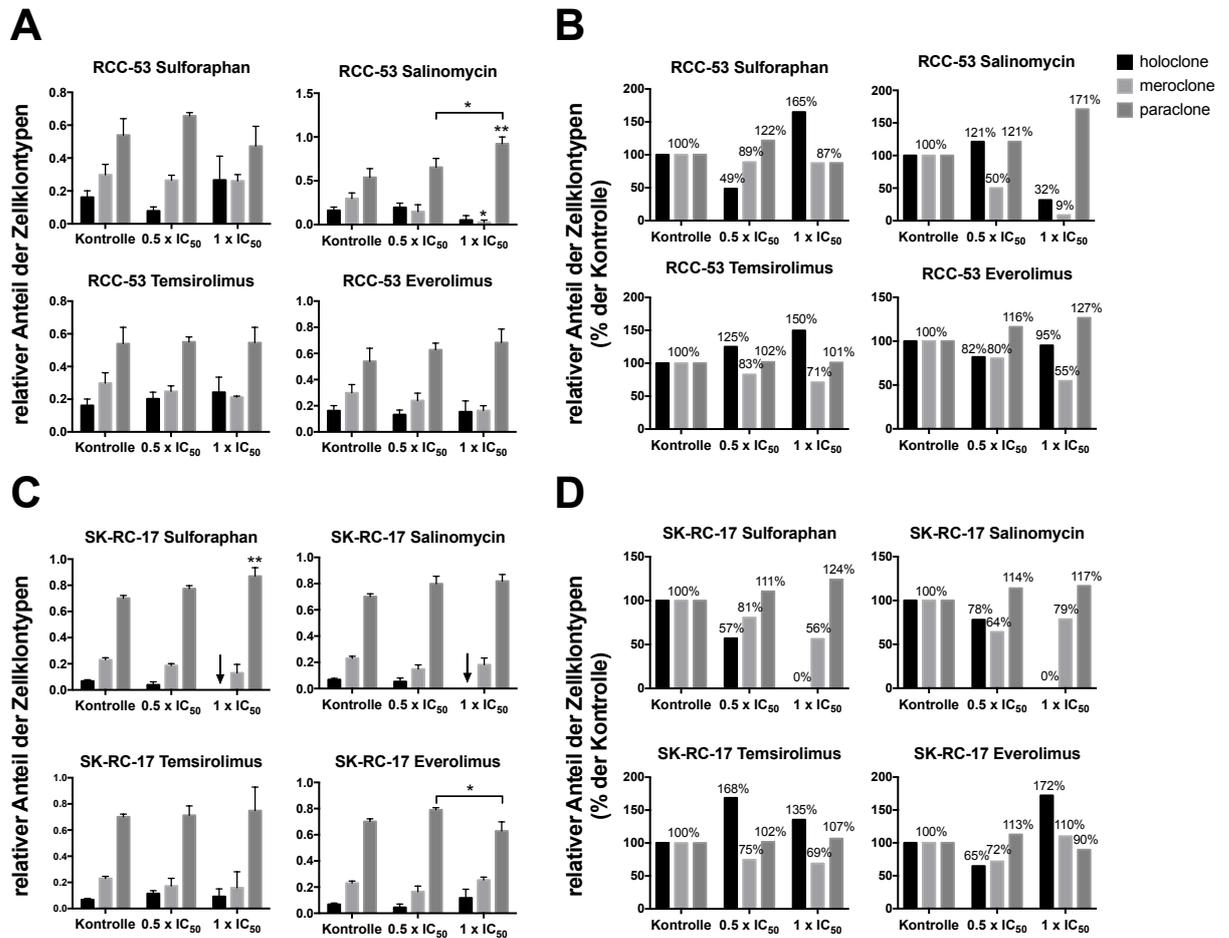


Abbildung 22: **Selektive Hemmung der Ausbildung von Holoklonen durch Sulforaphan und Salinomycin.** Es wurden 300 Zellen RCC-53 oder SK-Rc-17 in 12-well-Mikrotiterplatten ausgesät. Die Substanzen Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus wurden in den Konzentrationen halbe und einfache IC₅₀ (für RCC-53 Sulforaphan: 2,8 µM; Salinomycin: 0,04 µM; Temsirolimus: 1,2 µM; Everolimus: 0,25 µM; für SK-Rc-17 Sulforaphan: 3,3 µM; Salinomycin: 0,05 µM; Temsirolimus: 1,9 µM; Everolimus: 0,1 µM) verwendet. Nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen wurden die entstandenen Zellkolonien mit Methyleneblau gefärbt und fixiert. Anschließend erfolgte eine Unterscheidung in die Zellkolonietypen Holo-, Mero-, und Paraklone und die Auszählung der Zellkolonien unter dem Lichtmikroskop. Es wurde im Gegensatz zu Abbildung 21 der relative Anteil der Zellkolonietypen an der Gesamtzellkoloniezahl grafisch mit SEM dargestellt (A und C). Darstellung der relativen Anteile der Zellkolonietypen auf den Mittelwert der Kontrolle normiert (B und D). Die Pfeile kennzeichnen den Abfall der Anzahl von Holoklonen auf Null. Dieser Versuch wurde mindestens dreimal wiederholt. Zur Prüfung der statistischen Signifikanz wurde die zweifache ANOVA mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0.03$ angewendet. $p \leq 0.0332$ *; $p \leq 0.0021$ **

Paraklone und eine prozentuale Verminderung der Holo- und Meroklone, was auf eine selektive Inhibition von Tumorstammzellen hinweist. Diese Reduktion des relativen Anteils an Holoklonen unter Einfluss von Salinomycin ist jedoch nicht signifikant. Temsirolimus führt zu einem Anstieg der Holoklone. Beide mTOR-Inhibitoren führen zu einem Abfall des Anteils an Meroklonen. Insgesamt ist bei den mTOR-Inhibitoren jedoch von keiner Veränderung des Verhältnis der Zellkolonietypen auszugehen.

Unter dem Einfluss von Sulforaphan und Salinomycin kommt es bei SK-RC-17 zu einer Abnahme des Anteils der Mero- und Holoklone und zu einer Steigerung der Fraktion der Paraklone. Bei der einfachen IC_{50} -Konzentration führt Sulforaphan zu einer Abnahme des Meroklonanteils auf 56%, Salinomycin zu einer Abnahme auf 79%. Bei den Holoklonen ist sogar eine komplette Inhibition zu beobachten, hier fällt der Anteil unter Wirkung von Sulforaphan und Salinomycin auf 0% ab. Die mTOR-Inhibitoren führen bei SK-RC-17 allerdings zu einem relativen Anstieg der Holoklone. Die Behandlung mit Temsirolimus zeigt eine Abnahme der Fraktion der Meroklone. Die Anteile der restlichen Zellkolonietypen bleiben etwa konstant. Auch hier ist von einem geringen Einfluss der mTOR-Inhibitoren auf das Verhältnis der Zellkolonietypen auszugehen.

Es kann für den *colony formation assay* zusammengefasst werden, dass die Inhibitoren Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus sowohl zu einer Abnahme der Gesamtzahl der Zellkolonien als auch zu einer Reduktion der Anzahl an Zellkolonien bei jedem einzelnen Typen Holo-, Mero-, und Paraklon führen. Lediglich Sulforaphan und Salinomycin bewirken eine Abnahme des relativen Anteils an Holoklonen bei SK-RC-17. Durch die Inhibitoren kommt es zu leichten Schwankungen der relativen Anteile der einzelnen Zellkolonietypen, aber es sind wenig signifikante Unterschiede zu sehen.

4.5 Reduktion des Tumolvolumens durch Sunitinib und Salinomycin

Von den vier untersuchten Inhibitoren scheint Salinomycin in der selektiven Hemmung der Tumorstammzellen am erfolgversprechendsten zu sein (siehe Abbildung 15, 18, 21, 22). Aus diesem Grund wurde die Wirkung von Salinomycin *in vivo* getestet. Unter den bisher in der Standardtherapie verwendeten Medikamenten befindet sich Sunitinib (STB). Es wird die Wirkung von Salinomycin im Vergleich zum klinisch etablierten Inhibitor Sunitinib sowie eine mögliche synergistische Wirkung untersucht. Im Tierversuch wurden vier Gruppen NOD/SCID-Mäuse mit Placebo, Sunitinib, Salinomycin bzw. der Kombination Sunitinib

und Salinomycin behandelt. Die Verabreichung der Inhibitoren wurde bei einem Tumorumfang von 100 mm^3 gestartet. Unter der Wirkstoffgabe wurde das Wachstum der Tumoren beobachtet. In den Abbildungen 23A bis D wurde das Tumorumfang im Verlauf der Behandlungszeit dargestellt. Die Therapie wurde am Tag 19 begonnen und wurde für 14 Tage fortgeführt. Gemeinsam mit der Wirkstoffapplikation wurden an jedem fünften Tag die Tumormasse und das Körpergewicht der Mäuse bestimmt. Sowohl in den Behandlungsgruppen mit der Monotherapie Sunitinib und Salinomycin als auch in der Kombinationsgruppe ist eine signifikante Reduktion des Tumorumfangs zu beobachten. Allerdings bewirkt die Einzeltherapie mit dem konventionellen Mittel Sunitinib eine stärkere Verkleinerung des Tumors als die Gabe von Salinomycin. In der Gruppe mit der Kombinationstherapie aus Sunitinib und Salinomycin ist der größte Effekt zu beobachten. Jedoch endet die graphische Darstellung bei Tag 29, da ab diesem Zeitpunkt alle Versuchstiere dieser Gruppe gestorben sind. Von Tag 29 auf Tag 34 ist eine verstärkte Abnahme der Tumormasse, sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den Behandlungsgruppen, zu beobachten. Dies ist wahrscheinlich auf den schlechten Allgemeinzustand der Mäuse zurückzuführen, was ebenfalls zu einer Verminderung des Tumorumfangs führte.

In der Kontrollgruppe sowie in der Behandlungsgruppe mit Monotherapie Sunitinib überlebten alle fünf Versuchstiere. In der Gruppe mit der Monotherapie Salinomycin überlebten drei von vier Tieren. In der Gruppe mit der Kombinationstherapie aus Salinomycin und Sulforaphan starben alle fünf NOD/SCID Mäuse. Das besonders schlechte Überleben in der Kombinationsgruppe könnte wahrscheinlich an einer schlechten Verträglichkeit der Doppelbehandlung liegen (siehe Abbildung 23E). Die Gewichtsmessung begann am Tag 19. Vorher waren die sechs-Wochen-jungen NOD/SCID Mäuse noch im Wachstum, daher erfolgten keine Gewichtsmessungen. Das Ausgangsgewicht wurde mit dem Start der Behandlung erfasst. Im Verlauf des Tierversuches wurde in allen Behandlungsgruppen eine Gewichtsabnahme beobachtet (siehe Abbildung 23F), was für einen schlechten Gesundheitszustand der Mäuse spricht. Ebenfalls wurde ein zunehmend zerzaustes Fell bei den Tieren beobachtet. Die schlechtere Fellpflege der Mäuse deutet auf einen reduzierten Allgemeinzustand hin.

Es kann für den Tierversuch zusammengefasst werden, dass Salinomycin und Sunitinib zu einer Reduktion des Tumorumfangs führen. Trotz der beobachteten Verkleinerung der Tumoren verschlechterte sich der klinische Zustand der Mäuse. Die besonders hohe Letalität in der Behandlungsgruppe mit der Kombinationstherapie lässt eine schlechte Verträglichkeit bei einer gleichzeitigen Gabe von Sunitinib und Salinomycin vermuten.

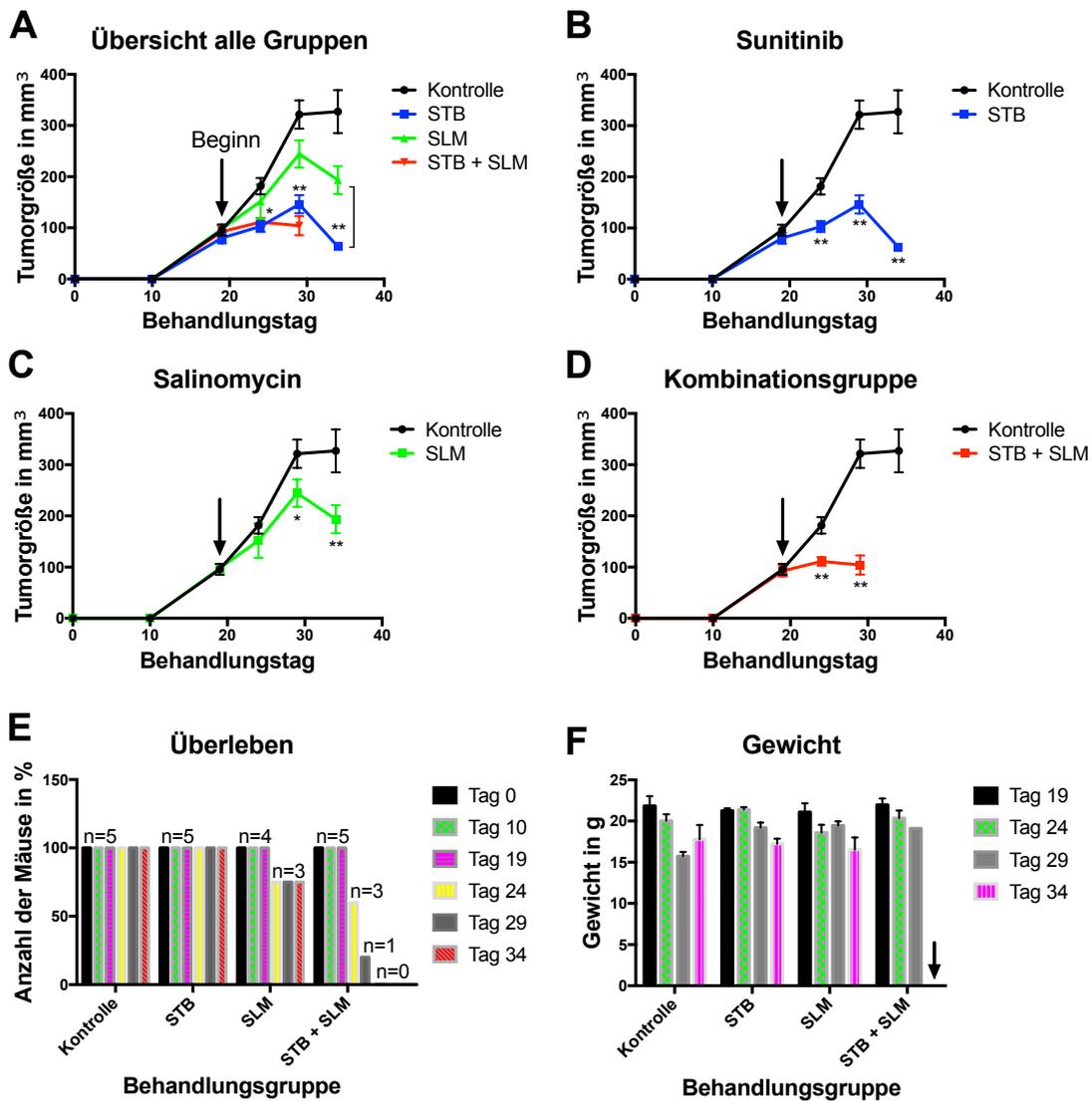


Abbildung 23: **Reduktion des Tumorvolumens unter Sunitinib- und Salinomycintherapie.** In die Flanken der Mäuse wurden beidseitig je 40.000 RCC-53 Zellen injiziert. Den Versuchstieren der vier Behandlungsgruppen wurden ab einem Tumorvolumen von 100 mm^3 (bei Versuchstag 19) für zwei Wochen täglich Sunitinib (STB) 40 mg pro kg Körpergewicht p.o., Salinomycin (SLM) 5 mg pro kg Körpergewicht i.p., Citrat-Puffer 40 mg pro kg Körpergewicht per oral oder die Kombinationstherapie mit Sunitinib 40 mg pro kg Körpergewicht p.o. plus Salinomycin 5 mg pro kg Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Zur Bestimmung der geeigneten Inhibitor-dosis orientierten wir uns an vorangegangenen Publikationen (Larkin et al., 2012; Zhang et al., 2013). Die Bestimmung des Tumorvolumens und des Körpergewichtes erfolgte alle fünf Tage. Dargestellt wird das Tumorvolumen unter Therapie in Abhängigkeit von der Zeit (A-D). Es wurde das Überleben der Versuchstiere in den einzelnen Therapiegruppen dargestellt (E). Zu sehen sind die Veränderungen des durchschnittlichen Gewichtes der Tiere während des Behandlungszeitraumes (F). Der Pfeil kennzeichnet die Kombinationsgruppe zum Behandlungstag 34, bei der alle Versuchstiere verstorben sind. Zur Prüfung der statistischen Signifikanz wurde der Multiple *t*-Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0.05$ angewendet. $p \leq 0.05$ *; $p \leq 0.01$ **

5 Diskussion

Aufgrund des Mangels an Symptomen zeigen Patienten mit RCC häufig bereits Metastasen zum Diagnosezeitpunkt (Siegel et al., 2014). Das RCC ist mit einer hohen Resistenz gegenüber konventionellen Chemotherapeutika und einer schlechten Prognose verbunden (Coppin et al., 2011; Bellmunt et al., 2014). Die Therapie des fortgeschrittenen RCCs mit TKI führt zu einer Verkleinerung des Tumors, jedoch kommt es häufig zu Rezidiven (Coppin et al., 2011; Schutz et al., 2014). Bei diesem Phänomen spielen wahrscheinlich Tumorstammzellen eine wichtige Rolle. Sie sind verantwortlich für die Tumorgenese sowie die Therapieresistenz und führen zu Rezidiven (Reya et al., 2001; Khan et al., 2015). Daher ist für die komplette Remission eine gezielte Bekämpfung von Tumorstammzellen notwendig. Vielversprechende Substanzen zeigen bereits Anti-Tumorstammzelleigenschaften bei diversen humanen Tumoren (Prud'homme, 2012). Unter diesen Hemmstoffen befinden sich Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus, wobei die mTOR-Inhibitoren bereits in der aktuellen Therapie des RCCs eingesetzt werden (Hutson, 2011). Gegenstand dieser Arbeit ist die Erforschung der Wirkung von Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus auf Tumorstammzellen im RCC. Durch eine selektive Inhibition der Tumorstammzellen im RCC kann ein neuer Therapiepfiler geschaffen werden, um die Prognose des RCCs zu verbessern.

5.1 Nachweis einer Subpopulation mit Tumorstammzelleigenschaften im klarzelligen Nierenzellkarzinom

Im Jahr 2008 konnten Bussolati et al. Tumorstammzellen im Nierenzellkarzinom identifizieren (Bussolati et al., 2008). Eine begrenzte Anzahl an Tumorstammzellen führt zur Aufrechterhaltung und zum Wachstum des Tumors, wie beispielsweise bei der AML (Bonnet and Dick, 1997), beim kolorektalen Karzinom (Boman et al., 2007) sowie beim Ovarial- und Mammakarzinom (Reya et al., 2001) nachgewiesen wurde. Um diese Tumorstammzellen nachzuweisen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Methoden *colony formation assay*, *sphere formation assay* und die Durchflusszytometrie zur Bestimmung des Tumorstammzelloberflächenmarkers CXCR4 verwendet. Die Grundlage für den *sphere formation assay* stellen serumfreies Medium und speziell beschichtete Kulturgefäße dar, welche schlechte Wachstumsbedingungen für normale Tumorzellen darstellen. Nur robuste, anpassungsfähige Tumorstammzellen sind in der Lage zu überleben, sich zu teilen und *spheres* auszubilden.

den. Diese Methode hat jedoch mehrere Nachteile. Der *sphere formation assay* ist sehr aufwendig und teuer, auch ist die Zellausbeute sehr gering. Mit der Methode *single-cell derived sphere formation* mittels einer Mikrokammer-Mikrofluidik-basierten Methode auf Chip-Basis von Chen et al. kann die Zellausbeute zur Identifizierung von Tumorstammzellen und für Analysen erhöht werden (Chen et al., 2016). Bei Tumorstammzellen handelt es sich um eine kleine Subpopulation, welche nur einen geringen Anteil im Gesamttumor darstellen (Boman et al., 2007; Reya et al., 2001). Diese These konnte in dieser Arbeit ebenfalls bestätigt werden (siehe Tabelle 5). Etwa 8% bis 12% der getesteten Nierenzellkarzinomzellen sind in der Lage, Zellkolonien auszubilden. Die Fähigkeit zur Generierung von Tumorspheres besitzen lediglich 1% der Tumorzellen. Etwa 5% bis 10% der Nierenzellkarzinomzellen zeigen eine positive CXCR4-Expression. Selbst die Zellen aus dissoziierten *spheres*, welche einen hohen Anteil an Tumorstammzellen besitzen, zeigen durchschnittlich nur zu 15% eine positive CXCR4-Expression.

	RCC-53	SK-RC-17
Effizienz zur Bildung von <i>spheres</i>	0,9 %	1,1 %
Effizienz zur Bildung von Zellkolonien	12,7 %	8,0 %
CXCR4-Expression der adhärennten Tumorzellen	10,8 %	4,7 %
CXCR4-Expression der Zellen aus dissoziierten <i>spheres</i>	15,7 %	15,4 %

Tabelle 5: Tumorstammzellen als kleine Subpopulation im Tumor.

Wie physiologisches Gewebe organisieren sich Tumorzellen hierarchisch. Es wird zwischen Stammzellen, Progenitorzellen und ausdifferenzierten Zellen unterschieden (Bonnet and Dick, 1997). Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich schließen, dass eine klare Einteilung in Tumorstammzellen und ausdifferenzierte Tumorzellen nicht möglich ist. Es ist von einem fließenden Übergang in der Hierarchie auszugehen, bei dem Tumorstammzeleigenschaften nach und nach abnehmen.

Im *colony formation assay* konnte die Hypothese der Existenz von verschiedenen "Zwischenstufen" von Tumorstammzellen mit unterschiedlichem Umfang an Stammzeleigenschaften bestätigt werden. Generell sind Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften in der Lage, Zellkolonien auszubilden. Die verschiedenen Morphologien der entstandenen Zellkolonien unterscheiden sich wiederum im Gehalt an Tumorstammzellen. Holoklone und Meroklone besitzen beide einen hohen Anteil an Tumorstammzellen. Beaver et al. konnten zeigen, dass Holoklone und Meroklone bei sekundärer Klonierung in der Lage waren, erneut Zellkolonien auszubilden, während Paraklone nur ein geringes Proliferationspotential aufweisen (Beaver et al., 2014). Holoklone können schneller und größere Tumoren als Pa-

raklone bilden (Patrawala et al., 2006; Jeter et al., 2009; Kalirai et al., 2011). In diesen Studien wird u.a. die Fähigkeit von Paraklonen beschrieben, neue Tumoren zu generieren und setzt voraus, dass Paraklone Tumorstammzellen enthalten (Beaver et al., 2014). Dies bestätigt die Hypothese, dass sich in Tumoren die Tumorstammzelleigenschaften in der Zellhierarchie verschieben, so dass auch Progenitorzellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen (Beaver et al., 2014). Holoklone entstehen aus einer "echten" Tumorstammzelle. Meroklone und Paraklone entstehen wahrscheinlich aus Progenitorzellen mit Stammzelleigenschaften. Der Anteil an Holoklonen stellt unter den drei Morphologien den geringsten Anteil dar, während Paraklone am häufigsten vorkommen. Berechnet man die Kolonisationseffizienz allein für Holoklone ergeben sich 4,3% für RCC-53 und 1,1% für SK-RC-17. Daher wird vermutet, dass diese Tumorstammzellen, welche die Fähigkeit besitzen Holoklone zu formen, auch in der Lage sind Tumorspheres zu bilden. Der wahre Gehalt an Tumorstammzellen liegt in einer Tumorzelllinie demnach bei etwa 1%.

Auch im *sphere formation assay* zeigt sich durch die Entstehung von *spheres* in verschiedenen Größen, dass der Begriff Tumorstammzelle relativ ist. Prinzipiell ist davon auszugehen, dass Tumorzellen, welche die Fähigkeit besitzen Tumorspheres auszubilden, Stammzelleigenschaften besitzen. Die Beobachtung, dass nicht alle *spheres* die gleiche Größe besitzen, lässt darauf schließen, dass diese Tumorzellen ein unterschiedliches Ausmaß an Stammzelleigenschaften aufweisen.

Um Tumorstammzellen im RCC anzureichern und zu quantifizieren wurde der *sphere formation assay* und die Durchflusszytometrie zur Bestimmung des Tumorstammzellmarkers CXCR4 angewendet. Wie in der Arbeit von Gassenmaier et al., zeigt sich bei den Zelllinien RCC-53 und SK-RC-17 eine besonders starke CXCR4-Expression (siehe Abbildung 10) (Gassenmaier et al., 2013). CXCR4⁺-RCC-Zellen konnten *in vivo* in NOD-SCID-Mäusen schneller und größere Tumoren bilden (Gassenmaier et al., 2013). Im Gegensatz zu RCC-53 und SK-RC-17, welche einen höheren Anteil an CXCR4⁺-RCC-Zellen besitzen, waren RCC-26-Zellen nicht in der Lage, Tumoren auszubilden (Gassenmaier et al., 2013). Obwohl RCC-53 im Vergleich zu SK-RC-17 eine signifikant höhere Expression von CXCR4 zeigt, sind beide Zelllinien in der Lage, etwa gleich viele *spheres* zu bilden (SK-RC-17 bildet sogar mehr *spheres* aus) (siehe Abbildung 10). Die CXCR4-Expression muss nicht mit dem wahren Gehalt an Stammzellen korrelieren. Möglicherweise stellen die CXCR4⁺-Zellen lediglich eine Subpopulation der Tumorstammzellen innerhalb des Tumors dar. Daher sind die Ergebnisse möglicherweise nicht repräsentativ für alle Tumorstammzellen im Nierenzellkarzinom. Es existieren weitere Tumorstammzellmarker im RCC, wie CD105, CD133,

CD44 (Bussolati et al., 2008). Gassenmaier et al. zeigten jedoch für die Zelllinien RCC-26, RCC-53 und SK-RC-17 keine erhöhte Expression von CD105 und CD133 auf Tumorzellen aus dissoziierten *spheres* im Vergleich zu adhärennten Tumorzellen (Gassenmaier et al., 2013). Möglicherweise existieren weitere Tumorstammzellmarker für die Zelllinien RCC-26, RCC-53 und SK-RC-17, welche bisher nicht getestet wurden. Frank et al. stellten in Frage, ob die Identifizierung und Isolierung von Tumorstammzellen durch ihre Expression von spezifischen Oberflächenmarkern die "wahren Stammzellen" des Tumors aufdecken (Frank et al., 2010). Dennoch enthalten Tumorspheres eine höhere Anzahl an CXCR4⁺-Zellen (siehe Abbildung 10), was auch von Gassenmaier et al. gezeigt wurde (Gassenmaier et al., 2013). Eine Inhibition der CXCR4-Signalwege führt zur Reduktion des Spherewachstums (Micucci et al., 2015). Die Aktivierung von *hypoxia-inducible factor-2α* (HIF2α) trägt zur Fähigkeit der Selbsterneuerung in *spheres*, und damit zur Entstehung von Tumorstammzellen in RCC, bei und bietet damit einen Angriffspunkt, die Induktion von Tumorstammzellen zu unterbinden (Micucci et al., 2015). Im Folgenden soll nun auf die Eigenschaften der getesteten Inhibitoren und ihren Einfluss auf Tumorstammzellen im klarzelligem Nierenzellkarzinom eingegangen werden.

5.2 Sulforaphan

Sulforaphan führt bei RCC-26 in geringeren Konzentrationen zunächst zu einer Steigerung der Zellvitalität (siehe Abbildung 11). Der Inhibitor Sulforaphan zeigt hormetische Effekte: geringe Dosen des Isomers R-Sulforaphan fördern die mesenchymale Stammzellproliferation und schützen sie vor Apoptose und Seneszenz, während hohe Dosen an R-Sulforaphan einen zytotoxischen Effekt auslösen und zur Induktion des Zellzyklusarrest und zur Apoptose führen (Zanichelli et al., 2012). Ob Sulforaphan die Proliferation von Tumorstammzellen inhibiert oder stimuliert ist also konzentrationsabhängig. Dieses paradoxe Verhalten von Sulforaphan wurde auch von Mendelsohn et al. beschrieben. Tumorsuppressorgene, wie *NRF2*, werden für die chemopräventiven Effekte von Sulforaphan benötigt, dennoch ist *NRF2* auch in der Lage, aggressive Tumorphänotypen aufrecht zu erhalten, die Proliferation zu stimulieren und Tumorzellen vor Chemotherapie zu schützen (Mendelsohn and Larrick, 2014). Für die Zelllinien RCC-53 und SK-RC-17 ist dieser stimulierende Konzentrationsbereich noch etwas geringer und daher in dem hier verwendeten Konzentrationsbereich nicht erfasst. Dennoch ist bei geringeren Konzentrationen in der Langzeitbehandlung kein Anstieg der Zellvitalität zu beobachten. Es scheint, dass nicht nur die Konzentration, sondern auch die Behandlungszeit eine wichtige Rolle spielt, ob Sulforaphan zytotoxisch oder protektiv auf

Tumorstammzellen wirkt.

Bei den Versuchen mit Sulforaphan ließ sich ein weiteres Phänomen beobachten: ein Anstieg der Fluoreszenz bei hohen Sulforaphankonzentrationen. Die Glaubhaftigkeit dieser Beobachtung ist hoch einzuschätzen, da dieses Phänomen bei allen Zelllinien, selbst bei Zellen aus dissoziierten *spheres*, auftrat. Dieser Fluoreszenzanstieg ab den Konzentrationen 40 μM und 80 μM konnte durchgängig in allen Messungen beobachtet werden, während simultan durchgeführte Versuche mit den anderen Inhibitoren nie zu einem derartigen Anstieg führten. Ein Anstieg der Zellvitalität in diesen Konzentrationen ist jedoch ausgeschlossen, da bereits bei einer Konzentration von 40 μM die Vitalitätskurven auf Null absinken und damit fast alle Zellen tot sind. Weiterhin zeigten sich unter dem Lichtmikroskop direkt vor der Messung im Fluorometer keine lebenden Zellen mehr. Auch konnte durch den fehlenden Anstieg der Fluoreszenz bei der alleinigen Messung von Sulforaphan ohne Tumorzellen eine Autofluoreszenz ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 12). Die Fluoreszenz dieser Messungen in verschiedenen Sulforaphankonzentrationen entsprach dem Leerwert. Da dieser Fluoreszenzanstieg nur bei Anwesenheit der RCC-Zellen auftritt, vermuten wir eine Reaktion von Sulforaphan mit Zellbestandteilen oder Proteinen, welche zu dieser verstärkten Fluoreszenz führen. Derartige Phänomene von Sulforaphan wurden in der Literatur bisher nicht beschrieben. Es konnte mikroskopisch beobachtet werden, dass Resazurin in der lebenden Zelle zu Resofurin reduziert wird (O'Brien et al., 2000). Das Resazurin penetriert die Zelle und wird durch mitochondriale, zytosolische und mikrosomale Enzyme reduziert (Gonzalez and Tarloff, 2001). Das fluoreszierende Endprodukt Resofurin diffundiert anschließend wieder aus der Zelle in das umgebende Zellmedium (O'Brien et al., 2000). Da vor der Zugabe von CellTiter-Blue mikroskopisch bereits keine lebenden Tumorzellen mehr zu beobachten waren, gehen wir davon aus, dass die steigende Fluoreszenz nicht durch eine gesteigerte Umwandlung von Resazurin zu Resofurin hervorgerufen wird. Bei der Apoptose, dem programmierten Zelltod, kommt es zu einer nuklearen und zytoplasmatischen Kondensierung. Die Zelle zerfällt in gut erhaltene Apoptosekörperchen, welche anschließend in Phagosomen autolytisch werden (Kerr et al., 1972). Die Nekrose hingegen, welche beispielsweise von Toxinen verursacht werden kann, führt durch Membrandefekte zu einem unkontrollierten Austritt von Zellinhalt (Fawthrop et al., 1991; Majno and Joris, 1995). Es ist bekannt, dass Sulforaphan zur Apoptose von Tumorzellen führt (Zanichelli et al., 2012), möglicherweise kommt es bei hohen Inhibitorkonzentrationen sogar zu Nekrosen. Wird die Zellmembran durch sehr hohe Konzentrationen von Sulforaphan zerstört, gelangen die Zellorganellen ins Medium. Sulforaphan könnte, als Reduktionsmittel, mit den freigesetzten Enzymen reagieren, den Fluoreszenzfarbstoff Resofurin bilden und

so zu der verstärkten Hintergrundfluoreszenz führen. Diese Hypothese führt zu der Frage, ob die Fluoreszenz weiter ansteigen würde, wenn man die Konzentration von Sulforaphan erhöht. Möglicherweise führen die anderen Inhibitoren zu ähnlichen Reaktionen, was jedoch durch einen unterschiedlichen Exzitations- bzw. Emissionsbereich nicht erfasst wurde.

In der Tabelle 6 findet sich eine Zusammenfassung zu den Ergebnissen der Wirkungen der Inhibitoren auf die RCC-Zelllinien. In unseren Versuchen wurde das R-Sulforaphan verwendet (siehe Abschnitt 2.3), welches eine überlegene Wirkung im Vergleich zu seinem S-Isomer zeigt (Abdull Razis et al., 2011). Abgesehen von der erhöhten Fluoreszenz bei hohen Sulforaphankonzentrationen ist die Zytotoxizität auf adhärenzte Tumorzellen und Zellen der dissoziierten *spheres* sehr ähnlich (siehe Abbildung 14). Bei der Zelllinie SK-RC-17 gibt es einen signifikanten Unterschied bei nur zwei von neun Konzentrationswerten (siehe Abbildung 15), daher ist dieser Unterschied als nicht relevant zu werten. Die zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen wird durch eine Induktion der Apoptose hervorgerufen (Kallifatidis et al., 2009). In diesem Versuchsabschnitt konnte allerdings keine selektive Inhibition von Sulforaphan auf Tumorstammzellen nachgewiesen werden, was wahrscheinlich durch eine beginnende Differenzierung der Zellen aus dissoziierten *spheres* hervorgerufen wird. Sulforaphan führt zu einer Inhibition der CXCR4⁺-Zellpopulation (siehe Tabelle 6). Eine Vorbehandlung mit dem Wirkstoff Sulforaphan führt zu einer nicht signifikanten Hemmung der Ausbildung von *spheres* bei RCC-53, während bei SK-RC-17 es sogar zu einer vermehrten Ausbildung von *spheres* kommt. Dafür gibt es zwei Erklärungsansätze: Eine Möglichkeit wäre, dass es zwar zu einer Inhibition der CXCR4⁺-Zellpopulation kommt, jedoch existieren innerhalb des Tumors weitere Tumorstammzellpopulationen, die nicht inhibiert werden und zur Bildung von *spheres* führen. Eine andere Erklärung wäre, dass die Vorbehandlung mit Sulforaphan nicht effektiv ist oder nicht lang genug war. In der zweiten Inkubationsphase können sich die Tumorzellen wieder erholen und es kommt zur Ausbildung von *spheres*. Die zweite Hypothese widerspricht jedoch der bisher beschriebenen chemopräventiven Wirkung von Sulforaphan (Weisburger, 1999). Zudem sind die besonders großen Fehlerbalken in diesem Versuch zu erwähnen. Diese lassen sich dadurch erklären, dass nach der Vorbehandlung die Menge der ausgesäten Zellen nicht gemeinsam ausgezählt wurde. Für die Kontrolle und jeden einzelnen Hemmstoff wurden die Zellen separat ausgezählt und ausgesät, während beim Zytotoxizitätsassay und bei der direkten Sulforaphaninkubation unter nicht-adhärenzten Bedingungen die Zellen gemeinsam auf die Mikrotiterplatten ausgesät wurden. Hier sind Schwankungen zwischen verschiedenen *wells* geringer, da durch das gemeinsame Aussäen die Zellverteilung in den *wells* regelmäßiger ist. Daher sind die Ergebnisse des Vorbehandlungsversuch nicht so valide wie die anderen Versuchsergebnisse

Versuch	Sulforaphan		Salinomycin		Temsirolimus		Everolimus	
	RCC-53	SK-RC-17	RCC-53	SK-RC-17	RCC-53	SK-RC-17	RCC-53	SK-RC-17
Selektive Zytotoxizität auf Tumorstammzellen ¹	↔	↔	↓	↔	↓	↑	↓	↔
Inhibition der CXCR4-Expression nach Vorbehandlung	↔	↓	↔	↓	↔	↔	↔	↑
Inhibition der Ausbildung von <i>spheres</i> nach Vorbehandlung	↓	↔/↑ ²	↓	↓	↔	↔	↓	↓
Inhibition der Ausbildung von <i>spheres</i> unter Langzeitbehandlung	↔	↓	↔	↔	↔	↓	↔	↔
Inhibition der Ausbildung von Zellkolonien unter Langzeitbehandlung	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔
Abnahme des Anteils von Holo-klonen unter Langzeitbehandlung	↑	↓	↓	↓	↑	↑	↔	↑
Inhibition des Tumorwachstums <i>in vivo</i>	—	—	↔	—	—	—	—	—

Tabelle 6: Überblick zur Wirkung der Inhibitoren auf RCC-53 und SK-RC-17. Legende: ↔ = kein Unterschied; ↑ oder ↓ = nicht signifikanter Unterschied; ↑↑ oder ↓↓ = signifikanter Unterschied; ↓ oder ↔ = Inhibition; ↑ oder ↑↑ = keine Inhibition; — = nicht getestet.

¹ Vergleich der IC₅₀-Konzentrationen zwischen adhärennten Tumorzellen und adhärennten Tumorzellen aus dissoziierten *spheres*

² kein Unterschied in der Anzahl der großen *spheres* und signifikant höhere Anzahl der kleinen *spheres*

und die Resultate sollten zurückhaltend interpretiert werden.

Sulforaphan führt bei direkter Inkubation zur Inhibition der Ausbildung und des Wachstums von *spheres*. Diese Ergebnisse konnten ebenfalls im oralen Plattenepithelkarzinom und im Mammakarzinom gezeigt werden (Liu et al., 2016; Fisher et al., 2015). Durch eine Inhibition von HIF2 hemmt Sulforaphan die Fähigkeit der *spheres* zur Selbsterneuerung (Feitelson et al., 2015). Sulforaphan führt ebenfalls zur Hemmung der absoluten Anzahl der Zellkolonietypen bei direkter Inkubation, was auch die Ergebnisse von Liu et al. im oralen Plattenepithelkarzinom bestätigt (Liu et al., 2016). Zur Senkung des Anteils an Holoklonen kommt es allerdings nur bei der Zelllinie SK-RC-17, während bei RCC-53 Sulforaphan nicht zu einer Senkung des Anteils an Holoklonen führt. Absolut werden alle Zellkolonietypen gesenkt, die Inhibition der Meroklone und Paraklone ist jedoch stärker. Es werden Progenitorzellen mit Stammzeleigenschaften durch Sulforaphan abgetötet, Tumorstammzellen werden auch eliminiert, jedoch im geringeren Verhältnis. Eine Zusammenfassung für die Wirkung von Sulforaphan auf RCC ist, dass Sulforaphan Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften inhibiert. Es konnte eine Inhibition der CXCR4⁺-Tumorstammzellpopulation, eine Hemmung der Ausbildung von *spheres* und von Zellkolonien nachgewiesen werden. Die Hemmung auf Tumorstammzellen ist allerdings nicht als selektiv zu beschreiben, da Tumorzellen und Progenitorzellen mit Stammzeleigenschaften ebenfalls eliminiert werden. Zudem sind die inhibitorischen Wirkungen von Konzentration und Inkubationszeit abhängig.

5.3 mTOR-Inhibitoren

Die Wirkung der mTOR-Inhibitoren auf Tumorzellen der dissoziierten *spheres* in RCC-53 ist geringfügig toxischer als auf adhärente Zellen. Bei SK-RC-17 zeigt sich für Temsirolimus eine stärkere Hemmung auf adhärente Tumorzellen und für Everolimus hingegen kein Unterschied (siehe Tabelle 6). Everolimus führt bei RCC-53 zu einem signifikanten Unterschied bei vier von neun Konzentrationswerten (siehe Abbildung 14), jedoch ist bei der Start- und Endkonzentration die Zellvitalität wieder gleich, daher gehen wir von keinem Unterschied aus. Die gleiche zytotoxische Wirkung auf dissoziierte *spheres* und adhärente Zellen könnte zum einen auf die kurze Inkubationszeit von nur 24 Stunden und zum anderen auf die bereits erwähnte beginnende Ausdifferenzierung der Tumorstammzellen zurückzuführen sein.

Die mTOR-Inhibitoren führen zu einer Inhibition der CXCR4⁺-Zellpopulation und zu einer Hemmung der Ausbildung von *spheres* bei RCC-53 nach Vorbehandlung. Hier führen

die mTOR-Inhibitoren also zu einer Hemmung der CXCR4⁺-Tumorstammzellpopulation. Interessant wäre hier die Bestimmung der CXCR4-Expression nach einer Erholungszeit, um zu beurteilen, ob sich die CXCR4⁺-Tumorstammzellen regenerieren können oder die CXCR4⁺-Zellpopulation dauerhaft vermindert bleibt. Im Mammakarzinom konnte ebenfalls eine Inhibition der *mammosphere formation* durch mTOR-Inhibitoren beobachtet werden (Karthik et al., 2015). Auch Cai et al. berichten von einer Hemmung der Ausbildung von *spheres* und Unterdrückung eines Tumorstammzellmarkers, der ALDH-Aktivität (Cai et al., 2014).

Bei SK-RC-17 hingegen rief die Vorbehandlung mit den mTOR-Inhibitoren trotz einer verstärkten CXCR4-Expression, eine Inhibition der Ausbildung und des Wachstums von *spheres* hervor. Eine Hypothese wäre, dass eine erhöhte bzw. verminderte Expression nicht zwangsläufig mit dem Anteil an Tumorstammzellen korrelieren muss. Nicht ausschließlich Tumorstammzellen, sondern auch ausdifferenzierte Tumorzellen und Progenitorzellen können in der Lage sein, CXCR4 zu exprimieren. Möglicherweise steht bei SK-RC-17 ein anderer Tumorstammzellmarker im Vordergrund, dessen Expression nach einer mTOR-Inhibitor Vorbehandlung gesenkt werden würde. Die Tumorstammzellen repräsentieren eine heterogene Population, welche möglicherweise nicht homogen sensitiv gegenüber einem bestimmten Anti-Tumorstammzellwirkstoff ist (Magee et al., 2012; Lorico and Rappa, 2011). Die andere Hypothese wäre also, dass unter dem Selektionsdruck durch die Inhibitoren therapieresistente Tumorstammzellpopulationen in der Lage sind, sich hervorzuheben (Shackleton et al., 2009). Möglicherweise ist die CXCR4⁺-Population in SK-RC-17 resistenter als in RCC-53, denn auch die Inhibitoren Sulforaphan und Salinomycin zeigen nur eine nicht signifikante Hemmung der CXCR4-Expression in SK-RC-17, während die Hemmung der CXCR4⁺-Population im RCC-53 bei allen Hemmstoffen signifikant ist (siehe Tabelle 6).

Nach direkter Langzeitinkubation wurde eine Inhibition des Wachstums der *spheres* nur mit Temsirolimus bei SK-RC-17 beobachtet. Sonst kam es zu keiner signifikanten Inhibition der Ausbildung von *spheres* (siehe Tabelle 6). Bei den achtfachen IC₅₀ handelt es sich bereits um sehr hohe Konzentrationen, bei der eigentlich die meisten Zellen tot sein müssten. RCC-53 und SK-RC-17 sind jedoch weiterhin in der Lage *spheres* auszubilden. Die mTOR-Inhibitoren wurden wie Sulforaphan und Salinomycin in DMSO aufgelöst, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Durch die Aliquotierung und die damit ständige Kühlung bis zur Verdünnung mit Tumorzellmedium, ist ein Verlust der Wirkung eher unwahrscheinlich. Möglicherweise war eine Inkubation von sieben Tagen nicht lang genug, um eine Wirkung zu beobachten. Im Vergleich hierzu wurden die Zellen nach der 7-tägigen Vorbehandlung für

weitere sieben Tage unter nicht adhärennten Bedingungen weiter inkubiert. Erst hier konnte sich eine Hemmung auf die *Sphere*ausbildung zeigen. Für diese Hypothese spricht ebenfalls die beginnende Hemmung des *Spherewachstums* bei SK-RC-17 durch Temsirolimus. Lui et al. beobachteten eine Inhibition der Zellproliferation, eine Senkung der Zellkolonienanzahl und -größe bei Langzeitbehandlungen mit Everolimus von 17 Tagen (Lui et al., 2016). Da die mTOR-Inhibitoren die Synthese von VEGF-14 und HIF-1 α hemmen (Mattei et al., 2014; Hudson et al., 2002), ist es plausibel, dass der Wirkungseintritt erst nach angepasster Proteinexpression beobachtet werden kann.

Beide mTOR-Inhibitoren führen zu einer Abnahme der absoluten Anzahl der Zellkolonietypen, jedoch wird keine relative Verminderung des Anteils an Holoklonen beobachtet (siehe Tabelle 6). Die Ausbildung von Zellkolonien ist typisch für Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften. Holoklone besitzen den höchsten Anteil an Tumorstammzellen und scheinen im Vergleich zu den anderen Zellkolonietypen eine höhere Resistenz zu besitzen. Bei Resistenzen gegenüber mTOR-Inhibitoren spielen Tumorstammzellen wahrscheinlich eine Rolle (Kornakiewicz et al., 2014). Die aus Glioblastom stammenden Zelllinien U251 und T98G wurden über mehrere Wochen mit steigenden Temsirolimuskonzentrationen behandelt. Es zeigt sich eine Senkung der Kolonisationseffizienz bei U251, während bei T98G keine Senkung beobachtet wird (Stepanenko et al., 2016). Nur die Kolonisationseffizienz wurde beurteilt, eine Einteilung in die verschiedenen Zellkolonietypen erfolgte hier nicht. Auch zeigt sich hier, dass Inhibitoren auf verschiedene Zelllinien, welche aus dem gleichen Karzinom stammen, unterschiedliche Wirkungen zeigen können, welche auf die tumorale Heterogenität zurückzuführen ist (Magee et al., 2012).

Es wird für die mTOR-Inhibitoren zusammengefasst, dass eine Inhibition der CXCR4⁺-Population nur bei RCC-53 nachgewiesen wurde. Um die Ausbildung von *spheres* zu hemmen, scheint eine längere Inkubationszeit notwendig zu sein. Die Langzeitbehandlung zeigt eher Wirkungen auf Progenitorzellen und wenig Wirkung auf Holoklone, also die eigentlichen Tumorstammzellen. Es existiert nur wenig Literatur über die Hemmung von *spheres*, es wird von Resistenzen gesprochen (Kornakiewicz et al., 2014). mTOR-Inhibitoren haben nur eine Wirkung auf die Progenitorzellen mit wenig Stammzeleigenschaften, die echten Tumorstammzellen besitzen Resistenzen und werden durch die mTOR-Inhibitoren kaum angegriffen.

5.4 Salinomycin

In der Kurzzeitbehandlung führt die Höchstkonzentration von Salinomycin zu einer Abnahme der Zellvitalität auf nur 30% bzw. 45%, während bei allen anderen Inhibitoren die Vitalität fast auf Null absinkt (siehe Abbildung 11). Dies weist auf die begrenzte apoptotische Wirkung von Salinomycin auf RCC-Zellen hin. Idealerweise sollten die Zellvitalitätskurven aller Inhibitoren einen sigmoidalen Verlauf zeigen. Dazu wurde hier der Konzentrationsbereich nicht weit genug gewählt. Das Ziel dieser Messreihe war die Bestimmung der IC_{50} , jedoch wäre es interessant zu ermitteln, bei welcher Konzentration von Salinomycin sich die Zellvitalität auf 0% reduziert. Hingegen ist die IC_{50} von Salinomycin in der Langzeitbehandlung sehr niedrig. Diese starke zytotoxische Wirkung in der Langzeitbehandlung lässt sich durch eine molekulare Anpassung, beispielsweise bei Inhibition des Signalweges Wnt/ β -Catenin (Lu et al., 2011) oder bei Apoptoseinduktion durch Reduktion von ABC-Transportern (Fuchs et al., 2009), erklären. Die zytotoxische Wirkung ist erst in der Langzeitbehandlung deutlich zu sehen. Zu erwähnen ist auch, dass für die 7-Tage-Inkubation die Zellen sehr dünn ausgesät wurden. Dadurch kam es teilweise zur Bildung von Zellkolonien, welche einen höheren Anteil an Tumorstammzellen besitzen. Dies erklärt ebenfalls die starke zytotoxische Wirkung von Salinomycin in der Langzeitbehandlung, wenn man davon ausgeht, dass Salinomycin Tumorstammzellen hemmt.

Bei der Zelllinie SK-RC-17 führt Salinomycin im Zytotoxizitätsassay zu einer selektiven Inhibition von Tumorstammzellen. Für die Zelllinie RCC-53 wurde dieses Ergebnis allerdings nicht beobachtet. Die Inkubation von Zellen aus dissoziierten *spheres* unter adhärennten Bedingungen führt wieder zu einer Ausdifferenzierung der Tumorstammzellen. Möglicherweise schreitet diese Ausdifferenzierung der Zelllinie RCC-53 schneller voran als bei SK-RC-17. Gassenmaier et al. bestimmten die CXCR4-Expression, um diese Differenzierung zu quantifizieren. Bei RCC-53 sinkt die CXCR4-Expression nach 3 Tagen Ausplattierung von 39,21% auf 6,48%, im Vergleich dazu betrug die CXCR4-Expression bei adhärennten RCC-53 2,65%. Bei SK-RC-17 sinkt die CXCR4-Expression von 22,0% auf 0,27%. Die Expression der adhärennten Zellen betrug 0,31% (Gassenmaier et al., 2013). Laut Gassenmaier et al. führt eine Inkubation unter adhärennten Bedingungen nach drei Tagen zur Reduktion der Stammzeleigenschaften. Jedoch handelt es sich bei diesen Werten um eine einzelne Messung. Die CXCR4-Expression kann selbst innerhalb einer Zelllinie stark schwanken, die Expression anderer Tumorstammzellmarker wurde nicht ermittelt. Dennoch muss davon ausgegangen werden, dass beim Zytotoxizitätsassay (mit einer Gesamtinkubationszeit von 48 Stunden) sich die Tumorstammzellen wieder ausdifferenzieren, zwar nicht komplett, aber zu einem

gewissen Teil. Interessant wären hier Versuche zur Bestimmung, wann sich die replattierten Zellen komplett ausdifferenzieren, und in welcher Geschwindigkeit dies geschieht. Dies kann durch die Ermittlung weiterer Tumorstammzellmarker oder durch eine sekundäre Inkubation unter nicht adhärennten Bedingungen erfolgen.

Es ist nicht nur im Zytotoxizitätsassay mit Salinomycin eine unterschiedliche Wirkung des Inhibitors auf die Zelllinien RCC-53 und SK-RC-17 zu beobachten. Solche Gegensätze zeigen sich, wie weiter oben beschrieben, auch in der Ausbildung von *spheres* nach Vorbehandlung mit Sulforaphan oder in der CXCR4-Expression nach der Inkubation mit mTOR-Inhibitoren, obwohl beide Zelllinien vom klarzelligem Nierenzellkarzinom stammen. Diese Beobachtung ist auf die Heterogenität der Tumorzellen zurückzuführen (Fidler and Hart, 1982; Fidler and Kripke, 1977; Nowell, 1976). Selbst innerhalb einer Zelllinie kam es zur unterschiedlichen Expression von CXCR4 und zur unterschiedlichen Ausbildung von *spheres*. Die Tumorzellpopulationen unterliegen einer ständigen Veränderung, die durch genetische Mutationen und epigenetische Modifikationen bedingt sind (Nowell, 1976; Baylin and Jones, 2011). Dies führt möglicherweise auch zu einem unterschiedlichem Gehalt an Tumorstammzellen je nach Zellpassage.

Salinomycin führt zu einer Inhibition der CXCR4⁺-Zellpopulation, welche bei der Zelllinie SK-RC-17 allerdings nicht signifikant ist (siehe Tabelle 6). Auch die Inhibition der Ausbildung und des Wachstums von *spheres* nach Vorbehandlung ist nicht signifikant, was auf die oben beschriebene Methode des separaten Zählvorgangs der verschiedenen Behandlungsgruppen zurückzuführen ist. Während der direkten Inkubation zeigt Salinomycin eine signifikante Inhibition der Ausbildung und des Wachstums von *spheres*. Auch in der Literatur werden diese Eigenschaften beschrieben: Salinomycin inhibiert die Fähigkeit der Tumorzellen zur Ausbildung von *spheres* und Expression von Tumorstammzellmarker, wie ALDH1, im Mammakarzinom (Gong et al., 2010) und im Lungenkarzinom (Larzabal et al., 2013). Bardsley et al. beschreiben die Hemmung der CD44⁺-CD34⁺-Kit⁻ Tumorstammzellsubpopulation durch Salinomycin (Bardsley et al., 2010). Für den *sphere formation assay* verwendeten Larzabal et al. ebenfalls serumfreies Zellkulturmedium mit Wachstumsfaktoren und B27-Zusätzen. Die Inkubation erfolgte in 6-*well-ultra-low-attachment*-Platten für sieben bis zehn Tage. Nach dem Ernten wurden die dissoziierten Zellen erneut unter serumfreien Bedingungen für sieben bis zehn Tage mit 1 µM Salinomycin inkubiert und anschließend die Anzahl der *spheres pro well* bestimmt (Larzabal et al., 2013). Bei der Wahl dieser Salinomycinkonzentration orientierten sich Larzabal et al. an der aktuellen Literatur (Gupta et al., 2009). Trotz unserer deutlich geringeren Salinomycinkonzentrationen konnte dennoch die

Inhibition der *spheres* beobachtet werden. Ein weiterer Unterschied ist, dass wir nicht dissoziierte *spheres*, sondern adhärenente Zellen behandelten. Es ist davon auszugehen, dass dissoziierte *spheres* einen höheren Anteil an Tumorstammzellen enthalten und daher wahrscheinlich eine bessere Wirkung erzielt werden kann. Generell sind beide Versuchsweisen interessant.

Salinomycin bewirkt sowohl eine Hemmung der absoluten Anzahl der Zellkolonietypen als auch eine Senkung des Anteils an Holoklonen (siehe Tabelle 6). Die verhältnismäßig stärkere Hemmung der Holoklone spricht für die selektivere Inhibition von Tumorstammzellen durch Salinomycin, welche allerdings nicht signifikant ist. Auch hier zeigten Larzabal et al. ähnliche Ergebnisse. ALDH⁺-Populationen wurden sortiert, 500 Zellen pro *well* wurden in 6-*well*-Mikrotiterplatten ausplattiert und unter adhärenenten Bedingungen mit Salinomycin inkubiert. Nach zehn Tagen wurden die Kolonien mit 4% Formalin fixiert und mit 2% Kristallviolett gefärbt. Die Anzahl der Kolonien pro *well* wurde bestimmt (Larzabal et al., 2013). Auch hier ähneln sich die Versuchsanordnungen. Interessant wäre eine Vorbehandlung mit Salinomycin, aber auch mit den anderen Inhibitoren, gewesen, um Veränderungen der Kolonisationseffizienz zu beurteilen.

Für Salinomycin lässt sich *in vitro* Folgendes zusammenfassen: es zeigt eine Inhibition von Tumorstammzellen, hemmt die CXCR4⁺-Population, hemmt Ausbildung von *spheres* und Zellkolonien, hier senkt Salinomycin besonderes den Anteil an Holoklonen. Salinomycin induziert nicht nur die Apoptose von Tumorstammzellen, sondern auch von Tumorzellen, welche keine Tumorstammzeleigenschaften aufweisen. Dieser Inhibitor ist in der Lage verschiedene Typen von humanen Tumorzellen, inklusive multipel resistente Tumorzellen, zu eliminieren (Fuchs et al., 2009; Naujokat et al., 2010; Mathema et al., 2012; Kourelis and Siegel, 2012; Fuchs et al., 2010). Salinomycin induziert Apoptose in akuten leukämischen T-Zellen, jedoch nicht in normalen humanen T-Zellen und peripheren Lymphozyten, welche von gesunden Probanden isoliert wurden (Fuchs et al., 2009; Lu et al., 2011). Dies spricht für die Selektivität gegenüber malignen Zellen. Ob Salinomycin Tumorstammzellen selektiv inhibiert, hängt davon ab, ob die Hemmung auf Tumorstammzellen stärker ausgeprägt ist als auf normale Tumorzellen. Die selektive Zytotoxizität auf Tumorstammzellen war lediglich für die Zelllinie SK-RC-17 signifikant. Auch die Ergebnisse der selektiven Hemmung der Holoklone im *colony formation assay* waren für beide Zelllinien nicht signifikant (siehe Tabelle 6). Auch wenn die Frage der selektiven Hemmung nicht eindeutig geklärt wurde, könnte Salinomycin einen höheren Beitrag zur Eradikation von Tumoren führen als Substanzen, die ausschließlich Tumorstammzellen oder normale Tumorzellen inhibieren (Naujokat and

Steinhart, 2012).

In vivo zeigt die Monotherapie mit Salinomycin eine signifikante Hemmung des Tumorstamms, bleibt jedoch der Wirkung von Sunitinib unterlegen. Salinomycin zeigt starke toxische Wirkungen auf Tumorzellen und verursacht lethale Wirkungen als Chemotherapie *in vivo* (Rowan, 2009). Salinomycin greift nicht nur Tumorstammzellen an, sondern ist ebenfalls in der Lage, andere Typen und Subtypen von Tumorzellen zu eliminieren, welche keine Tumorstammzelleigenschaften aufweisen (Naujokat et al., 2010; Kourelis and Siegel, 2012; Mathema et al., 2012). Durch die Induktion von Apoptose in Tumorzellen wurde die signifikante Tumorstammzellpopulation vermutlich hervorgerufen. Sunitinib hingegen führt zu einer Eliminierung der meisten Tumorzellen, resistente Tumorstammzellen, welche nur einen sehr geringen Teil des Tumorstamms darstellen, bleiben verschont. Gassenmaier et al. zeigten eine starke Resistenz von *spheres* gegenüber Sunitinib (Gassenmaier et al., 2013). Salinomycin führt möglicherweise eher zur Eliminierung der Tumorstammzellen, jedoch zu keiner extremen Reduktion des Tumorstamms. Während Substanzen, die eine beachtliche Tumorstammzellregression in fortgeschrittenen Stadien bewirken, nur einen minimalen Effekt auf die Tumorstammzellpopulation besitzen, zeigen tumorspezifische Therapeutika eine geringere Wirkung auf das Tumorstammwachstum, jedoch einen relevanten Vorteil in frühen Stadien der malignen Erkrankung sowie als neoadjuvante und adjuvante Therapieform (McDermott and Wicha, 2010). Auch das beim Mammakarzinom etablierte Paclitaxel reduziert deutlich das Volumen des Primärtumors, steigert jedoch die Anzahl an metastatischen Herden. Salinomycin hingegen führt kaum zu einer Verkleinerung des Primärtumors, zeigt jedoch eine Hemmung der Lungenmetastasen (Larzabal et al., 2013). Interessant wären hier die Bestimmung der CXCR4-Expression im explantierten Tumor durch Tumorschnittfärbung oder Durchflusszytometrie nach Dissoziation des Tumors. Bei frisch entnommenen Zellen wäre auch eine Kultivierung im serumfreien Medium nach Dissoziation und eine Bestimmung der *Sphere*ausbeute möglich, um Veränderungen im Anteil der Tumorstammzellen zu beurteilen.

Die Kombinationstherapie mit Salinomycin und Sunitinib zeigt ebenfalls eine signifikante Reduktion des Tumorstamms, jedoch verstarben alle Versuchstiere dieser Gruppe vor dem Behandlungsende. Es stellt sich die Frage, wie valide die Ergebnisse der Kombinationstherapie sind, da alle Tiere verstorben sind und daher nur wenige Messungen möglich waren. Die Ursache der toxischen Kombination waren möglicherweise die hohen Konzentrationen an Salinomycin und Sunitinib. Durch synergistische Wirkungen der Inhibitoren wäre eine Konzentrationsreduktion im Vergleich zur Monotherapie vorteilhafter gewesen. Weiterhin

waren die Mäuse in der Kombinationsgruppe durch doppelte Substanzgabe, oral und intraperitoneal, stärkerem Stress ausgesetzt. Für einen besseren Vergleich hätte eine weitere Kontrollgruppe, oral und intraperitoneal, mit einem Placebo behandelt werden müssen.

Wenn die Haupttumormasse nicht an der Entstehung und dem Fortbestehen des Tumors beteiligt ist, reicht möglicherweise nur die Bekämpfung der Tumorstammzellen aus? Die restlichen Tumorzellen könnten durch das eigene Immunsystem eliminiert werden. Ein Vorteil wäre die Senkung der Rate von Nebenwirkungen und Komplikationen von Kombinationstherapien und damit eine bessere Verträglichkeit für die Patienten. Diese Hypothese ist leider nicht umsetzbar, da durch die alleinige Elimination von Tumorstammzellen, bereits ausdifferenzierte Zellen durch Signale der Stromazellen Stammzeleigenschaften annehmen können. Das dynamische Tumorstammzellmodell beschreibt, dass durch den Einfluss der Mikroumgebung eine Dedifferenzierung möglich ist (Vermeulen et al., 2012). Nur eine Kombinationstherapie kann zu einer langfristigen Tumorregression führen. Tumorstammzellen repräsentieren eine heterogene Population, welche möglicherweise nicht homogen sensitiv gegenüber einem bestimmten Anti-Tumorstammzellwirkstoff ist (Magee et al., 2012; Lorico and Rappa, 2011). Unter dem Selektionsdruck durch die Inhibitoren sind therapieresistente Tumorstammzellen in der Lage sich hervorzuheben (Shackleton et al., 2009). Aufgrund dessen ist eine komplette Eradikation der Tumorstammzellen durch den Eingriff mehrerer Wirkstoffe auf verschiedene intrinsische Signalwege notwendig, um das Überleben von resistenten Mutanten zu reduzieren (Mueller et al., 2009).

5.5 Ausblick

Die Frage dieser Arbeit war, ob die Wirkstoffe Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus zu einer selektiven Inhibition von Tumorstammzellen führen. Für keine der Substanzen ist die Inhibition auf Tumorstammzellen als selektiv zu beschreiben, da nicht nur Tumorstammzellen, sondern auch Progenitorzellen mit Stammzeleigenschaften und Tumorzellen im RCC eliminiert werden. Des Weiteren war die bisher gezeigte Selektivität, vor allem bei Salinomycin, nicht signifikant und konnte nicht für alle Zelllinien nachgewiesen werden. Sulforaphan hemmt Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften. Ob dieser Inhibitor wirklich Tumorstammzellen hemmt, konnte nicht eindeutig bewiesen werden. mTOR-Inhibitoren hemmen kaum Tumorstammzellen, sie führen eher zur Inhibition von Progenitorzellen mit Stammzeleigenschaften. Trotz seiner nicht selektiven Wirkung könnte Salinomycin unter den getesteten Substanzen den höchsten Beitrag zur Eliminierung der Tumorstammzellen

führen. Auch seine toxische Wirkung auf normale Tumorzellen trägt zur Eliminierung des Tumors bei. Eine erfolgreiche Heilung würde die Eradikation aller malignen Zellen erfordern: die Tumorstammzellen und ihre Abkömmlinge (Naujokat and Steinhart, 2012). Die effektivste Wirkung der tumorstammzellspezifischen Inhibitoren ergibt sich durch eine Kombination mit konventionellen Zytostatika. Solche Kombinationen ermöglichen die Eradikation der Tumorstammzellen, differenzierten Progenitorzellen sowie des Tumor**bulks** im Tumor der Patienten (Zhang et al., 2011, 2012). Die begrenzte Fähigkeit von Salinomycin den Tumor**bulk** zu eradizieren, könnte möglicherweise durch die Kombination mit konventionellen Chemotherapeutika ausgeglichen werden.

Die Behandlung des fortgeschrittenen RCC hat sich mit der Einführungen von mTOR-Inhibitoren signifikant gebessert (Motzer et al., 2008; Hudes et al., 2007), jedoch ist ihre Wirkung aufgrund von Entwicklung von Resistenzen limitiert, was wahrscheinlich auf die fehlende Inhibition von Tumorstammzellen zurückzuführen ist. An dieser Stelle kann möglicherweise eine Kombinationstherapie mit Salinomycin einen Vorteil bringen, um diese Resistenzen zu überwinden. Es könnte auch der Einsatz von weiteren Wirkstoffen mit tumorstammzellinhibitorischen Eigenschaften notwendig sein, um einen dauerhaften Erfolg zu erzielen. Eine komplette Eradikation der Tumorstammzellen durch den Eingriff mehrerer Wirkstoffe auf verschiedene intrinsische Signalwege ist notwendig (Mueller et al., 2009). Durch die Anwendung von Inhibitoren, wie Salinomycin, kann durch die Bekämpfung der Tumorstammzellen möglicherweise die Prognose des RCCs gebessert werden.

Solche Kombinationstherapien sollten sowohl *in vitro*, also auch *in vivo* getestet werden. Weiterhin stellt sich die Frage, ob diese Substanzen auch somatische Stammzellen hemmen. Könnte sich der menschliche Körper von einer Therapie erholen, die zur Eliminierung von Stammzellen führt? Um diese Frage zu klären, sind zunächst Tierversuche notwendig, eventuell nicht nur in Mäusen, sondern auch in nicht-humanen Primaten, wie Pavianen, deren Genetik dem Menschen ähneln. Auch der Einfluss der Inhibitoren auf Genexpression im RCC müsste analysiert werden. Versuche auf molekularer Ebene sollten klären, ob diese Substanzen zur Inhibition von tumorstammzelltypischen Signalwegen, wie Notch, Wnt/ β -Catenin und Hedgehog, führen und die Expression von typischen Transkriptionsfaktoren und Proteinen, wie Nanog und Sox2, im RCC hemmen.

6 Zusammenfassung

Das klarzellige Nierenzellkarzinom ist eine maligne Erkrankung der Niere mit gering ausgeprägter Symptomatik. Durch die häufige Bildgebung wird heutzutage das klarzellige Nierenzellkarzinom meist zufällig diagnostiziert. Dennoch wird die Diagnose teilweise erst im fortgeschrittenen Stadium gestellt, wenn sich bereits Fernmetastasen gebildet haben. Jährlich sterben weltweit etwa 140.000 Menschen am klarzelligen Nierenzellkarzinom. Trotz der Fortschritte durch den Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren beim fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom bleibt die Prognose mangelhaft. Diese schlechte Prognose ist auf die Existenz von Tumorstammzellen zurückzuführen, die zu Resistenzen gegenüber Chemo- und Strahlentherapien sowie zu Rezidiven führen. Tumorstammzellen besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie zur Differenzierung und tragen zur Entstehung, Aufrechterhaltung und Progredienz der Tumoren bei. Um eine komplette Remission des Tumors zu erreichen, müssen Tumorstammzellen gezielt bekämpft werden. Durch die Eliminierung von Tumorstammzellen können die Resistenzen überwunden und Rezidive vermieden werden. Dazu wurden die Inhibitoren Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus getestet, welche in verschiedenen humanen Tumoren hemmende Wirkungen auf Tumorstammzellen zeigen. Die mTOR-Inhibitoren Temsirolimus und Everolimus werden bereits zur Therapie des klarzelligen Nierenzellkarzinoms eingesetzt. Zielsetzung dieser Arbeit ist zu überprüfen, ob diese Inhibitoren gezielt Tumorstammzellen angreifen. Die Hypothese lautet: die Substanzen Sulforaphan, Salinomycin, Temsirolimus und Everolimus führen zu einer selektiven Inhibition von Tumorstammzellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom.

Zur Überprüfung der Selektivität wurde der *drug sensitivity assay* mit Tumorzellen und Tumorstammzellen unter adhärennten Bedingungen durchgeführt. Lediglich Salinomycin führte bei der Zelllinie SK-RC-17 zu einer selektiven Hemmung der Tumorstammzellen, während die anderen Inhibitoren Tumorzellen und Tumorstammzellen etwa gleich stark hemmten. Die Limitierung dieser Methode ist die schnelle Ausdifferenzierung von Tumorstammzellen unter adhärennten Bedingungen. Durch den Verlust der Stammzeleigenschaften nähern sich die Vitalitätskurven der Tumorstammzellen denen der Tumorzellen an. Um den Anteil an Tumorstammzellen vor und nach der Behandlung mit den Inhibitoren zu quantifizieren, wurden die Methoden *sphere formation assay*, *colony formation assay* sowie die Durchflusszytometrie zur Bestimmung des Tumorstammzellmarkers CXCR4 angewendet. Für keinen der Inhibitoren konnte eine echte Selektivität gegenüber Tumorstammzellen nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde die Nebenhypothese aufgestellt, dass sich Tumorstammzeleigenschaften in der Tumorzellhierarchie verschieben, so dass auch Progenitorzellen Eigenschaften,

wie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, aufweisen können. Sulforaphan hemmt Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften, ob diese Substanz wirklich Tumorstammzellen inhibiert, konnte nicht eindeutig bewiesen werden. Auch für die mTOR-Inhibitoren Temsirolimus und Everolimus konnte lediglich eine Hemmung der Progenitorzellen mit Stammzeleigenschaften gezeigt werden. Salinomycin ist, unter den getesteten Substanzen, der einzige Wirkstoff, der sowohl eine Inhibition der Ausbildung von *spheres*, Zellkolonien, besonders der Holoklone, sowie eine Hemmung der CXCR4⁺-Subpopulation in RCC-53 und SK-RC-17 aufweist und damit als erfolgversprechendste Substanz in der Tumorstammzellbekämpfung hervorsticht. Salinomycin eliminiert sowohl Tumorzellen als auch Tumorstammzellen und könnte einen entscheidenden Beitrag zur zukünftigen Therapie des klarzelligen Nierenzellkarzinoms leisten. In Form einer Kombinationstherapie mit derzeitig verwendeten Präparaten, wie Sunitinib, sowie mit anderen tumorstammzellinhibierenden Wirkstoffen könnte Salinomycin durch die Eradikation von Tumorstammzellen eine komplette Remission ermöglichen.

Meiner Ansicht nach sind weitere Forschungen notwendig, um den wissenschaftlichen Kenntnisstand über die Wirkung dieser Inhibitoren auf das klarzellige Nierenzellkarzinom zu vertiefen und zu erweitern. Interessant wäre, ihren Einfluss auf tumorstammzelltypische genetische und epigenetische Veränderungen im Nierenzellkarzinom sowie ihren Effekt als Mono- und als Kombinationstherapie *in vivo* zu untersuchen.

7 Abkürzungsverzeichnis

A	ABC-Transporter	<i>ATP-binding cassette</i> Transporter
	AKT/PKB	AKT-Onkogene-Proteinkinase
	ALDH1	<i>aldehyde dehydrogenase isoform 1</i>
	AML	akute myeloische Leukämie
C	CD	<i>cluster of differentiation</i>
	c-Kit	Stammzellfaktor-Rezeptor
	CSC	<i>cancer stem cells</i>
	CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
	CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
D	DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
	DMSO	Dimethylsulfoxid
E	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
	EVR	Everolimus
F	FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
	FBS	<i>fetal bovine serum</i>
	FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
	FSC-A	<i>forward scatter-area</i>
	FSC-H	<i>forward scatter-height</i>
G	GIST	Gastrointestinaler Stromaler Tumor
H	HIF-1 α	Hypoxie-induzierte Faktor-1 α
	HIF-2 α	Hypoxie-induzierte Faktor-2 α
I	IC ₅₀	<i>half maximal inhibitory concentration</i>
	INF α	Interferon- α
K	KG	Körpergewicht
M	MEM	<i>Eagle's minimum essential medium</i>
	mRCC	<i>metastatic renal cell carcinoma</i>
	mTOR-Inhibitor	<i>mammalian target of rapamycin</i> Inhibitor
N	NANOG	Nanog <i>homeobox</i>
	NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
	NOD/SCID-Mäuse	<i>Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency</i> -Mäuse
	NRF2	<i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
O	OCT4	<i>octamer-binding transcription factor 4</i>
P	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
	PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>

	PI3K/AKT/mTOR	<i>phosphatidylinositol 3- kinase/akt/mammalian target of rapamycin</i>
R	RFA	Radiofrequenzablation
	RCC	<i>renal cell carcinoma</i>
	RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S	SEM	<i>standard error of the mean</i>
	SOX2	<i>sex-determining region Y-box 2</i>
	SFN	Sulforaphan
	STB	Sunitinib
	SK-RC	<i>Sloan Kettering renal cell cancer</i>
	SLM	Salinomycin
	SSC-A	<i>side scatter-area</i>
T	TKI	Tyrosinkinase-Rezeptor-Inhibitor
	TSR	Temsirolimus
V	VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
	VHL	von Hippel Lindau

8 Literaturverzeichnis

Literatur

- Abdull Razis, A. F., Iori, R., and Ioannides, C. (2011). The natural chemopreventive phytochemical r-sulforaphane is a far more potent inducer of the carcinogen-detoxifying enzyme systems in rat liver and lung than the s-isomer. *Int J Cancer*, 128(12):2775–82.
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., and Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(7):3983–8.
- Algaba, F., Akaza, H., Lopez-Beltran, A., Martignoni, G., Moch, H., Montironi, R., and Reuter, V. (2011). Current pathology keys of renal cell carcinoma. *Eur Urol*, 60(4):634–43.
- Alumkal, J. J., Slotke, R., Schwartzman, J., Cherala, G., Munar, M., Graff, J. N., Beer, T. M., Ryan, C. W., Koop, D. R., Gibbs, A., Gao, L., Flamiatos, J. F., Tucker, E., Kleinschmidt, R., and Mori, M. (2015). A phase II study of sulforaphane-rich broccoli sprout extracts in men with recurrent prostate cancer. *Invest New Drugs*, 33(2):480–9.
- Andersson, B., Janson, V., Behnam-Motlagh, P., Henriksson, R., and Grankvist, K. (2006). Induction of apoptosis by intracellular potassium ion depletion: using the fluorescent dye pbfi in a 96-well plate method in cultured lung cancer cells. *Toxicol In Vitro*, 20(6):986–94.
- Appari, M., Babu, K. R., Kaczorowski, A., Gross, W., and Herr, I. (2014). Sulforaphane, quercetin and catechins complement each other in elimination of advanced pancreatic cancer by mir-let-7 induction and k-ras inhibition. *Int J Oncol*, 45(4):1391–400.
- Baillargeon-Gagne, S., Jeldres, C., Lughezzani, G., Sun, M., Isbarn, H., Capitanio, U., Shariat, S. F., Crepel, M., Alasker, A., Widmer, H., Arjane, P., Patard, J. J., Perrotte, P., Montorsi, F., Graefen, M., and Karakiewicz, P. I. (2010). A comparative population-based analysis of the rate of partial vs radical nephrectomy for clinically localized renal cell carcinoma. *BJU Int*, 105(3):359–64.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., Dewhirst, M. W.,

- Bigner, D. D., and Rich, J. N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the dna damage response. *Nature*, 444(7120):756–60.
- Bardsley, M. R., Horvath, V. J., Asuzu, D. T., Lorincz, A., Redelman, D., Hayashi, Y., Popko, L. N., Young, D. L., Lomber, G. A., Urrutia, R. A., Farrugia, G., Rubin, B. P., and Ordog, T. (2010). Kitlow stem cells cause resistance to kit/platelet-derived growth factor alpha inhibitors in murine gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology*, 139(3):942–52.
- Barker, N., Bartfeld, S., and Clevers, H. (2010). Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs. *Cell Stem Cell*, 7(6):656–70.
- Barker, N., Ridgway, R. A., van Es, J. H., van de Wetering, M., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., Clarke, A. R., Sansom, O. J., and Clevers, H. (2009). Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature*, 457(7229):608–11.
- Barrandon, Y. and Green, H. (1987). Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(8):2302–6.
- Basu, D., Montone, K. T., Wang, L. P., Gimotty, P. A., Hammond, R., Diehl, J. A., Rustgi, A. K., Lee, J. T., Rasanen, K., Weinstein, G. S., and Herlyn, M. (2011). Detecting and targeting mesenchymal-like subpopulations within squamous cell carcinomas. *Cell Cycle*, 10(12):2008–16.
- Battelli, C. and Cho, D. C. (2011). mtor inhibitors in renal cell carcinoma. *Therapy*, 8(4):359–367.
- Baylin, S. B. and Jones, P. A. (2011). A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer*, 11(10):726–34.
- Beaver, C. M., Ahmed, A., and Masters, J. R. (2014). Clonogenicity: Holoclones and me-roclones contain stem cells. *PLoS One*, 9(2):e89834.
- Bellmunt, J., Puente, J., Garcia de Muro, J., Lainez, N., Rodriguez, C., and Duran, I. (2014). Seom clinical guidelines for the treatment of renal cell carcinoma. *Clin Transl Oncol*, 16(12):1043–50.
- Blute, M. L., Leibovich, B. C., Lohse, C. M., Cheville, J. C., and Zincke, H. (2004). The mayo

clinic experience with surgical management, complications and outcome for patients with renal cell carcinoma and venous tumour thrombus. *BJU Int*, 94(1):33–41.

Boman, B. M., Wicha, M. S., Fields, J. Z., and Runquist, O. A. (2007). Symmetric division of cancer stem cells—a key mechanism in tumor growth that should be targeted in future therapeutic approaches. *Clin Pharmacol Ther*, 81(6):893–8.

Bonnet, D. and Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 3(7):730–7.

Bruno, S., Bussolati, B., Grange, C., Collino, F., Graziano, M. E., Ferrando, U., and Camussi, G. (2006). Cd133+ renal progenitor cells contribute to tumor angiogenesis. *Am J Pathol*, 169(6):2223–35.

Bussolati, B., Bruno, S., Grange, C., Ferrando, U., and Camussi, G. (2008). Identification of a tumor-initiating stem cell population in human renal carcinomas. *FASEB J*, 22(10):3696–705.

Bussolati, B., Dekel, B., Azzarone, B., and Camussi, G. (2013). Human renal cancer stem cells. *Cancer Lett*, 338(1):141–146.

Cai, Z., Ke, J., He, X., Yuan, R., Chen, Y., Wu, X., Wang, L., Wang, J., Lan, P., and Wu, X. (2014). Significance of mtor signaling and its inhibitor against cancer stem-like cells in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*, 21(1):179–88.

Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T. L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E. Y., Gaber, M. W., Finklestein, D., Allen, M., Frank, A., Bayazitov, I. T., Zakharenko, S. S., Gajjar, A., Davidoff, A., and Gilbertson, R. J. (2007). A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*, 11(1):69–82.

Capitanio, U. and Montorsi, F. (2015). Renal cancer. *Lancet*, 387(10021):894–906.

Chang, L., Graham, P. H., Hao, J., Ni, J., Bucci, J., Cozzi, P. J., Kearsley, J. H., and Li, Y. (2013). Acquisition of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes is associated with activation of the pi3k/akt/mtor pathway in prostate cancer radioresistance. *Cell Death Dis*, 4:e875.

- Charles, N. and Holland, E. C. (2010). The perivascular niche microenvironment in brain tumor progression. *Cell Cycle*, 9(15):3012–21.
- Chen, Y. C., Ingram, P. N., Fouladdel, S., McDermott, S. P., Azizi, E., Wicha, M. S., and Yoon, E. (2016). High-throughput single-cell derived sphere formation for cancer stem-like cell identification and analysis. *Sci Rep*, 6:27301.
- Cho, E., Adami, H. O., and Lindblad, P. (2011). Epidemiology of renal cell cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*, 25(4):651–65.
- Chow, W. H., Dong, L. M., and Devesa, S. S. (2010). Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol*, 7(5):245–57.
- Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H., Jones, D. L., Visvader, J., Weissman, I. L., and Wahl, G. M. (2006). Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: Aacr workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, 66(19):9339–44.
- Coppin, C., Kollmannsberger, C., Le, L., Porzsolt, F., and Wilt, T. J. (2011). Targeted therapy for advanced renal cell cancer (rcc): a cochrane systematic review of published randomised trials. *BJU Int*, 108(10):1556–63.
- Creighton, C. J., Li, X., Landis, M., Dixon, J. M., Neumeister, V. M., Sjolund, A., Rimm, D. L., Wong, H., Rodriguez, A., Herschkowitz, J. I., Fan, C., Zhang, X., He, X., Pavlick, A., Gutierrez, M. C., Renshaw, L., Larionov, A. A., Faratian, D., Hilsenbeck, S. G., Perou, C. M., Lewis, M. T., Rosen, J. M., and Chang, J. C. (2009). Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(33):13820–5.
- Dean, M. (2009). Abc transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 14(1):3–9.
- Dong, T. T., Zhou, H. M., Wang, L. L., Feng, B., Lv, B., and Zheng, M. H. (2011). Salinomycin selectively targets 'cd133+' cell subpopulations and decreases malignant traits in colorectal cancer lines. *Ann Surg Oncol*, 18(6):1797–804.
- Dontu, G., Abdallah, W. M., Foley, J. M., Jackson, K. W., Clarke, M. F., Kawamura, M. J.,

- and Wicha, M. S. (2003a). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev*, 17(10):1253–70.
- Dontu, G., Al-Hajj, M., Abdallah, W. M., Clarke, M. F., and Wicha, M. S. (2003b). Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif*, 36 Suppl 1:59–72.
- Duff, S. E., Li, C., Garland, J. M., and Kumar, S. (2003). Cd105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J*, 17(9):984–92.
- Escudier, B., Eisen, T., Porta, C., Patard, J. J., Khoo, V., Algaba, F., Mulders, P., and Kataja, V. (2012). Renal cell carcinoma: Esmo clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 23 Suppl 7:vii65–71.
- Essers, M. A. and Trumpp, A. (2010). Targeting leukemic stem cells by breaking their dormancy. *Mol Oncol*, 4(5):443–50.
- Fawthrop, D. J., Boobis, A. R., and Davies, D. S. (1991). Mechanisms of cell death. *Arch Toxicol*, 65(6):437–44.
- Feitelson, M. A., Arzumanyan, A., Kulathinal, R. J., Blain, S. W., Holcombe, R. F., Mahajna, J., Marino, M., Martinez-Chantar, M. L., Nawroth, R., Sanchez-Garcia, I., Sharma, D., Saxena, N. K., Singh, N., Vlachostergios, P. J., Guo, S., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas, A. G., Bilisland, A., Amedei, A., Niccolai, E., Amin, A., Ashraf, S. S., Boosani, C. S., Guha, G., Ciriolo, M. R., Aquilano, K., Chen, S., Mohammed, S. I., Azmi, A. S., Bhakta, D., Halicka, D., Keith, W. N., and Nowsheen, S. (2015). Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Semin Cancer Biol*, pages Suppl:S25–54.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in globocan 2012. *Int J Cancer*, 136(5):E359–86.
- Fidler, I. J. and Hart, I. R. (1982). The development of biological diversity and metastatic potential in malignant neoplasms. *Oncodev Biol Med*, 4(1-2):161–76.
- Fidler, I. J. and Kripke, M. L. (1977). Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science*, 197(4306):893–5.
- Fisher, M. L., Adhikary, G., Grun, D., Kaetzel, D. M., and Eckert, R. L. (2015). The ezh2

- polycomb group protein drives an aggressive phenotype in melanoma cancer stem cells and is a target of diet derived sulforaphane. *Mol Carcinog*, 55(12):2024–2036.
- Frank, N. Y., Schatton, T., and Frank, M. H. (2010). The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest*, 120(1):41–50.
- Fuchs, D., Daniel, V., Sadeghi, M., Opelz, G., and Naujokat, C. (2010). Salinomycin overcomes abc transporter-mediated multidrug and apoptosis resistance in human leukemia stem cell-like kg-1a cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 394(4):1098–104.
- Fuchs, D., Heinold, A., Opelz, G., Daniel, V., and Naujokat, C. (2009). Salinomycin induces apoptosis and overcomes apoptosis resistance in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 390(3):743–9.
- Fulawka, L., Donizy, P., and Halon, A. (2014). Cancer stem cells—the current status of an old concept: literature review and clinical approaches. *Biol Res*, 47:66.
- Funes, J. M., Quintero, M., Henderson, S., Martinez, D., Qureshi, U., Westwood, C., Clements, M. O., Bourbouli, D., Pedley, R. B., Moncada, S., and Boshoff, C. (2007). Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(15):6223–8.
- Gago-Dominguez, M., Castelao, J. E., Yuan, J. M., Ross, R. K., and Yu, M. C. (2002). Lipid peroxidation: a novel and unifying concept of the etiology of renal cell carcinoma (united states). *Cancer Causes Control*, 13(3):287–93.
- Gao, M. Q., Choi, Y. P., Kang, S., Youn, J. H., and Cho, N. H. (2010). Cd24+ cells from hierarchically organized ovarian cancer are enriched in cancer stem cells. *Oncogene*, 29(18):2672–80.
- Gassenmaier, M., Chen, D., Buchner, A., Henkel, L., Schiemann, M., Mack, B., Schendel, D. J., Zimmermann, W., and Pohla, H. (2013). Cxc chemokine receptor 4 is essential for maintenance of renal cell carcinoma-initiating cells and predicts metastasis. *Stem Cells*, 31(8):1467–76.
- Gervais, D. A., McGovern, F. J., Arellano, R. S., McDougal, W. S., and Mueller, P. R. (2005). Radiofrequency ablation of renal cell carcinoma: part 1, indications, results, and role in

- patient management over a 6-year period and ablation of 100 tumors. *AJR Am J Roentgenol*, 185(1):64–71.
- Ginestier, C., Hur, M. H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C. G., Liu, S., Schott, A., Hayes, D., Birnbaum, D., Wicha, M. S., and Dontu, G. (2007). Aldh1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 1(5):555–67.
- Ginestier, C., Liu, S., Diebel, M. E., Korkaya, H., Luo, M., Brown, M., Wicinski, J., Cabaud, O., Charafe-Jauffret, E., Birnbaum, D., Guan, J. L., Dontu, G., and Wicha, M. S. (2010). Cxcr1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *J Clin Invest*, 120(2):485–97.
- Goldman, J. M. (2010). Chronic myeloid leukemia: a historical perspective. *Semin Hematol*, 47(4):302–11.
- Gong, C., Yao, H., Liu, Q., Chen, J., Shi, J., Su, F., and Song, E. (2010). Markers of tumor-initiating cells predict chemoresistance in breast cancer. *PLoS One*, 5(12):e15630.
- Gonzalez, R. J. and Tarloff, J. B. (2001). Evaluation of hepatic subcellular fractions for alamar blue and mtt reductase activity. *Toxicol In Vitro*, 15(3):257–9.
- Gratzke, C., Seitz, M., Bayrle, F., Schlenker, B., Bastian, P. J., Haseke, N., Bader, M., Tilki, D., Roosen, A., Karl, A., Reich, O., Khoder, W. Y., Wyler, S., Stief, C. G., Staehler, M., and Bachmann, A. (2009). Quality of life and perioperative outcomes after retroperitoneoscopic radical nephrectomy (rn), open rn and nephron-sparing surgery in patients with renal cell carcinoma. *BJU Int*, 104(4):470–5.
- Guerrero-Beltran, C. E., Mukhopadhyay, P., Horvath, B., Rajesh, M., Tapia, E., Garcia-Torres, I., Pedraza-Chaverri, J., and Pacher, P. (2012). Sulforaphane, a natural constituent of broccoli, prevents cell death and inflammation in nephropathy. *J Nutr Biochem*, 23(5):494–500.
- Gupta, P. B., Onder, T. T., Jiang, G., Tao, K., Kuperwasser, C., Weinberg, R. A., and Lander, E. S. (2009). Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell*, 138(4):645–59.
- Hemal, A. K., Kumar, A., Kumar, R., Wadhwa, P., Seth, A., and Gupta, N. P. (2007). Lapa-

- roscopic versus open radical nephrectomy for large renal tumors: a long-term prospective comparison. *J Urol*, 177(3):862–6.
- Hiraga, T., Ito, S., and Nakamura, H. (2013). Cancer stem-like cell marker cd44 promotes bone metastases by enhancing tumorigenicity, cell motility, and hyaluronan production. *Cancer Res*, 73(13):4112–22.
- Hirsch, H. A., Iliopoulos, D., Tsiachlis, P. N., and Struhl, K. (2009). Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer Res*, 69(19):7507–11.
- Hoffmann, N. E. and Bischof, J. C. (2002). The cryobiology of cryosurgical injury. *Urology*, 60(2 Suppl 1):40–9.
- Hollenbeck, B. K., Taub, D. A., Miller, D. C., Dunn, R. L., and Wei, J. T. (2006). National utilization trends of partial nephrectomy for renal cell carcinoma: a case of underutilization? *Urology*, 67(2):254–9.
- Hudes, G., Carducci, M., Tomczak, P., Dutcher, J., Figlin, R., Kapoor, A., Staroslawska, E., Sosman, J., McDermott, D., Bodrogi, I., Kovacevic, Z., Lesovoy, V., Schmidt-Wolf, I. G., Barbarash, O., Gokmen, E., O'Toole, T., Lustgarten, S., Moore, L., and Motzer, R. J. (2007). Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 356(22):2271–81.
- Hudes, G. R., Carducci, M. A., Choueiri, T. K., Esper, P., Jonasch, E., Kumar, R., Margolin, K. A., Michaelson, M. D., Motzer, R. J., Pili, R., Roethke, S., and Srinivas, S. (2011). Nccn task force report: Optimizing treatment of advanced renal cell carcinoma with molecular targeted therapy. *J Natl Compr Canc Netw*, 9(0 1):S1–29.
- Hudson, C. C., Liu, M., Chiang, G. G., Otterness, D. M., Loomis, D. C., Kaper, F., Giaccia, A. J., and Abraham, R. T. (2002). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol*, 22(20):7004–14.
- Hunt, J. D., van der Hel, O. L., McMillan, G. P., Boffetta, P., and Brennan, P. (2005). Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer*, 114(1):101–8.

- Hutson, T. E. (2011). Targeted therapies for the treatment of metastatic renal cell carcinoma: clinical evidence. *Oncologist*, 16 Suppl 2:14–22.
- Jeter, C. R., Badeaux, M., Choy, G., Chandra, D., Patrawala, L., Liu, C., Calhoun-Davis, T., Zaehres, H., Daley, G. Q., and Tang, D. G. (2009). Functional evidence that the self-renewal gene nanog regulates human tumor development. *Stem Cells*, 27(5):993–1005.
- Jordan, C. T. (2006). Searching for leukemia stem cells—not yet the end of the road? *Cancer Cell*, 10(4):253–4.
- Kalirai, H., Damato, B. E., and Coupland, S. E. (2011). Uveal melanoma cell lines contain stem-like cells that self-renew, produce differentiated progeny, and survive chemotherapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(11):8458–66.
- Kallifatidis, G., Labsch, S., Rausch, V., Mattern, J., Gladkich, J., Moldenhauer, G., Buchler, M. W., Salnikov, A. V., and Herr, I. (2011). Sulforaphane increases drug-mediated cytotoxicity toward cancer stem-like cells of pancreas and prostate. *Mol Ther*, 19(1):188–95.
- Kallifatidis, G., Rausch, V., Baumann, B., Apel, A., Beckermann, B. M., Groth, A., Mattern, J., Li, Z., Kolb, A., Moldenhauer, G., Altevogt, P., Wirth, T., Werner, J., Schemmer, P., Buchler, M. W., Salnikov, A. V., and Herr, I. (2009). Sulforaphane targets pancreatic tumour-initiating cells by nf-kappab-induced antiapoptotic signalling. *Gut*, 58(7):949–63.
- Karthik, G. M., Ma, R., Lovrot, J., Kis, L. L., Lindh, C., Blomquist, L., Fredriksson, I., Bergh, J., and Hartman, J. (2015). mtor inhibitors counteract tamoxifen-induced activation of breast cancer stem cells. *Cancer Lett*, 367(1):76–87.
- Kawasaki, B. T., Hurt, E. M., Mistree, T., and Farrar, W. L. (2008). Targeting cancer stem cells with phytochemicals. *Mol Interv*, 8(4):174–84.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4):239–57.
- Ketola, K., Hilvo, M., Hyotylainen, T., Vuoristo, A., Ruskeepaa, A. L., Oresic, M., Kallioniemi, O., and Iljin, K. (2012). Salinomycin inhibits prostate cancer growth and migration via induction of oxidative stress. *Br J Cancer*, 106(1):99–106.
- Khan, M. I., Czarnecka, A. M., Helbrecht, I., Bartnik, E., Lian, F., and Szczylik, C. (2015).

- Current approaches in identification and isolation of human renal cell carcinoma cancer stem cells. *Stem Cell Res Ther*, 6:178.
- Korkaya, H., Liu, S., and Wicha, M. S. (2011). Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *J Clin Invest*, 121(10):3804–9.
- Kornakiewicz, A., Solarek, W., Bielecka, Z. F., Lian, F., Szczylik, C., and Czarnecka, A. M. (2014). Mammalian target of rapamycin inhibitors resistance mechanisms in clear cell renal cell carcinoma. *Curr Signal Transduct Ther*, 8(3):210–8.
- Kourelis, T. V. and Siegel, R. D. (2012). Metformin and cancer: new applications for an old drug. *Med Oncol*, 29(2):1314–27.
- Kucia, M., Reza, R., Miekus, K., Wanzeck, J., Wojakowski, W., Janowska-Wieczorek, A., Ratajczak, J., and Ratajczak, M. Z. (2005). 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(7):879–94.
- Lane, B. R., Samplaski, M. K., Herts, B. R., Zhou, M., Novick, A. C., and Campbell, S. C. (2008). Renal mass biopsy—a renaissance? *J Urol*, 179(1):20–7.
- Lapidot, T. and Kollet, O. (2002). The essential roles of the chemokine sdf-1 and its receptor cxcr4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient nod/scid and nod/scid/b2m(null) mice. *Leukemia*, 16(10):1992–2003.
- Larkin, J., Esser, N., Calvo, E., Tsuchihashi, Z., Fiedler, U., Graeser, R., and Kim, D. (2012). Efficacy of sequential treatment with sunitinib-everolimus in an orthotopic mouse model of renal cell carcinoma. *Anticancer Res*, 32(7):2399–406.
- Larzabal, L., El-Nikhely, N., Redrado, M., Seeger, W., Savai, R., and Calvo, A. (2013). Differential effects of drugs targeting cancer stem cell (csc) and non-csc populations on lung primary tumors and metastasis. *PLoS One*, 8(11):e79798.
- Leibovich, B. C., Blute, M., Chevillie, J. C., Lohse, C. M., Weaver, A. L., and Zincke, H. (2004). Nephron sparing surgery for appropriately selected renal cell carcinoma between 4 and 7 cm results in outcome similar to radical nephrectomy. *J Urol*, 171(3):1066–70.
- Li, H., Liu, L., Guo, L., Zhang, J., Du, W., Li, X., Liu, W., Chen, X., and Huang, S. (2008a).

- Herg k⁺ channel expression in cd34⁺/cd38⁻/cd123(high) cells and primary leukemia cells and analysis of its regulation in leukemia cells. *Int J Hematol*, 87(4):387–92.
- Li, Q., Eades, G., Yao, Y., Zhang, Y., and Zhou, Q. (2014). Characterization of a stem-like subpopulation in basal-like ductal carcinoma in situ (dcis) lesions. *J Biol Chem*, 289(3):1303–12.
- Li, X., Lewis, M. T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C. K., Wu, M. F., Hilsenbeck, S. G., Pavlick, A., Zhang, X., Chamness, G. C., Wong, H., Rosen, J., and Chang, J. C. (2008b). Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*, 100(9):672–9.
- Li, Y., Zhang, T., Korkaya, H., Liu, S., Lee, H. F., Newman, B., Yu, Y., Clouthier, S. G., Schwartz, S. J., Wicha, M. S., and Sun, D. (2010). Sulforaphane, a dietary component of broccoli/broccoli sprouts, inhibits breast cancer stem cells. *Clin Cancer Res*, 16(9):2580–90.
- Li, Z. (2013). Cd133: a stem cell biomarker and beyond. *Exp Hematol Oncol*, 2(1):17.
- Liu, C. M., Peng, C. Y., Liao, Y. W., Lu, M. Y., Tsai, M. L., Yeh, J. C., Yu, C. H., and Yu, C. C. (2016). Sulforaphane targets cancer stemness and tumor initiating properties in oral squamous cell carcinomas via mir-200c induction. *J Formos Med Assoc*, 116(1):41–48.
- Liu, M., Sakamaki, T., Casimiro, M. C., Willmarth, N. E., Quong, A. A., Ju, X., Ojeifo, J., Jiao, X., Yeow, W. S., Katiyar, S., Shirley, L. A., Joyce, D., Lisanti, M. P., Albanese, C., and Pestell, R. G. (2010). The canonical nf-kappab pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion. *Cancer Res*, 70(24):10464–73.
- Ljungberg, B., Bex, A., Canfield, S., and al., e. (April 2014). Guidelines on renal cell carcinoma, update.
- Ljungberg, B., Cowan, N. C., Hanbury, D. C., Hora, M., Kuczyk, M. A., Merseburger, A. S., Patard, J. J., Mulders, P. F., and Sinescu, I. C. (2010). Eau guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update. *Eur Urol*, 58(3):398–406.
- Lorico, A. and Rappa, G. (2011). Phenotypic heterogeneity of breast cancer stem cells. *J Oncol*, 2011:135039.

- Lu, D., Choi, M. Y., Yu, J., Castro, J. E., Kipps, T. J., and Carson, D. A. (2011). Salinomycin inhibits wnt signaling and selectively induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(32):13253–7.
- Lui, A., New, J., Ogony, J., Thomas, S., and Lewis-Wambi, J. (2016). Everolimus downregulates estrogen receptor and induces autophagy in aromatase inhibitor-resistant breast cancer cells. *BMC Cancer*, 16:487.
- Ma, S., Lee, T. K., Zheng, B. J., Chan, K. W., and Guan, X. Y. (2008). Cd133+ hcc cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the akt/pkb survival pathway. *Oncogene*, 27(12):1749–58.
- Magee, J. A., Piskounova, E., and Morrison, S. J. (2012). Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell*, 21(3):283–96.
- Majno, G. and Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. an overview of cell death. *Am J Pathol*, 146(1):3–15.
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J., and Weinberg, R. A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4):704–15.
- Martelli, A. M., Evangelisti, C., Follo, M. Y., Ramazzotti, G., Fini, M., Giardino, R., Manzoli, L., McCubrey, J. A., and Cocco, L. (2011). Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/akt/mammalian target of rapamycin signaling network in cancer stem cells. *Curr Med Chem*, 18(18):2715–26.
- Marusyk, A. and Polyak, K. (2010). Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta*, 1805(1):105–17.
- Mathema, V. B., Koh, Y. S., Thakuri, B. C., and Sillanpaa, M. (2012). Parthenolide, a sesquiterpene lactone, expresses multiple anti-cancer and anti-inflammatory activities. *Inflammation*, 35(2):560–5.
- Mattei, J., da Silva, R. D., Sehrt, D., Molina, W. R., and Kim, F. J. (2014). Targeted therapy in metastatic renal carcinoma. *Cancer Lett*, 343(2):156–60.

- Maugeri-Sacca, M., Vigneri, P., and De Maria, R. (2011). Cancer stem cells and chemosensitivity. *Clin Cancer Res*, 17(15):4942–7.
- McDermott, S. P. and Wicha, M. S. (2010). Targeting breast cancer stem cells. *Mol Oncol*, 4(5):404–19.
- McGuire, B. B. and Fitzpatrick, J. M. (2011). Bmi and the risk of renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol*, 21(5):356–61.
- Mehlen, P. and Puisieux, A. (2006). Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer*, 6(6):449–58.
- Mendelsohn, A. R. and Larrick, J. W. (2014). Paradoxical effects of antioxidants on cancer. *Rejuvenation Res*, 17(3):306–11.
- Merlos-Suarez, A., Barriga, F. M., Jung, P., Iglesias, M., Cespedes, M. V., Rossell, D., Sevillano, M., Hernando-Momblona, X., da Silva-Diz, V., Munoz, P., Clevers, H., Sancho, E., Mangués, R., and Batlle, E. (2011). The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse. *Cell Stem Cell*, 8(5):511–24.
- Micucci, C., Matakchione, G., Valli, D., Orciari, S., and Catalano, A. (2015). Hif2alpha is involved in the expansion of cxcr4-positive cancer stem-like cells in renal cell carcinoma. *Br J Cancer*, 113(8):1178–85.
- Mihaly, Z., Sztupinszki, Z., Surowiak, P., and Gyorffy, B. (2012). A comprehensive overview of targeted therapy in metastatic renal cell carcinoma. *Curr Cancer Drug Targets*, 12(7):857–72.
- Mitani, M., Yamanishi, T., and Miyazaki, Y. (1975). Salinomycin: a new monovalent cation ionophore. *Biochem Biophys Res Commun*, 66(4):1231–6.
- Mitani, M., Yamanishi, T., Miyazaki, Y., and Otake, N. (1976). Salinomycin effects on mitochondrial ion translocation and respiration. *Antimicrob Agents Chemother*, 9(4):655–60.
- Miyazaki, Y., Shibuya, M., Sugawara, H., Kawaguchi, O., and Hirsoe, C. (1974). Salinomycin, a new polyether antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)*, 27(11):814–21.
- Mokhtari, R. B., Kumar, S., Islam, S. S., Yazdanpanah, M., Adeli, K., Cutz, E., and Yeger, H.

- (2013). Combination of carbonic anhydrase inhibitor, acetazolamide, and sulforaphane, reduces the viability and growth of bronchial carcinoid cell lines. *BMC Cancer*, 13:378.
- Molina, A. M., Feldman, D. R., Voss, M. H., Ginsberg, M. S., Baum, M. S., Brocks, D. R., Fischer, P. M., Trinos, M. J., Patil, S., and Motzer, R. J. (2012). Phase 1 trial of everolimus plus sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer*, 118(7):1868–76.
- Morrison, R., Schleicher, S. M., Sun, Y., Niermann, K. J., Kim, S., Spratt, D. E., Chung, C. H., and Lu, B. (2011). Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis. *J Oncol*, 2011:941876.
- Motzer, R. J., Escudier, B., Oudard, S., Hutson, T. E., Porta, C., Bracarda, S., Grunwald, V., Thompson, J. A., Figlin, R. A., Hollaender, N., Urbanowitz, G., Berg, W. J., Kay, A., Lebwohl, D., and Ravaud, A. (2008). Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase iii trial. *Lancet*, 372(9637):449–56.
- Motzer, R. J., Hutson, T. E., Tomczak, P., Michaelson, M. D., Bukowski, R. M., Rixe, O., Oudard, S., Negrier, S., Szczylik, C., Kim, S. T., Chen, I., Bycott, P. W., Baum, C. M., and Figlin, R. A. (2007). Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 356(2):115–24.
- Mueller, M. T., Hermann, P. C., Witthauer, J., Rubio-Viqueira, B., Leicht, S. F., Huber, S., Ellwart, J. W., Mustafa, M., Bartenstein, P., D’Haese, J. G., Schoenberg, M. H., Berger, F., Jauch, K. W., Hidalgo, M., and Heeschen, C. (2009). Combined targeted treatment to eliminate tumorigenic cancer stem cells in human pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 137(3):1102–13.
- Mukherjee, D. and Zhao, J. (2013). The role of chemokine receptor cxcr4 in breast cancer metastasis. *Am J Cancer Res*, 3(1):46–57.
- Naujokat, C., Fuchs, D., and Opelz, G. (2010). Salinomycin in cancer: A new mission for an old agent. *Mol Med Rep*, 3(4):555–9.
- Naujokat, C. and Steinhart, R. (2012). Salinomycin as a drug for targeting human cancer stem cells. *J Biomed Biotechnol*, 2012:950658.
- Negrier, S., Gravis, G., Perol, D., Chevreau, C., Delva, R., Bay, J. O., Blanc, E., Ferlay, C., Geoffrois, L., Rolland, F., Legouffe, E., Sevin, E., Laguerre, B., and Escudier, B. (2011).

- Temsirolimus and bevacizumab, or sunitinib, or interferon alfa and bevacizumab for patients with advanced renal cell carcinoma (torava): a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 12(7):673–80.
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194(4260):23–8.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., and Pognan, F. (2000). Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*, 267(17):5421–6.
- Ochocki, J. D. and Simon, M. C. (2013). Nutrient-sensing pathways and metabolic regulation in stem cells. *J Cell Biol*, 203(1):23–33.
- Okamoto, O. K. and Perez, J. F. (2008). Targeting cancer stem cells with monoclonal antibodies: a new perspective in cancer therapy and diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn*, 8(4):387–93.
- Pan, J., Mestas, J., Burdick, M. D., Phillips, R. J., Thomas, G. V., Reckamp, K., Belperio, J. A., and Strieter, R. M. (2006). Stromal derived factor-1 (sdf-1/cxcl12) and cxcr4 in renal cell carcinoma metastasis. *Mol Cancer*, 5:56.
- Park, J. H., Park, S. J., Chung, M. K., Jung, K. H., Choi, M. R., Kim, Y., Chai, Y. G., Kim, S. J., and Park, K. S. (2010). High expression of large-conductance ca^{2+} -activated k^{+} channel in the cd133+ subpopulation of sh-sy5y neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 396(3):637–42.
- Patrawala, L., Calhoun, T., Schneider-Broussard, R., Li, H., Bhatia, B., Tang, S., Reilly, J. G., Chandra, D., Zhou, J., Claypool, K., Coghlan, L., and Tang, D. G. (2006). Highly purified cd44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene*, 25(12):1696–708.
- Prasad, S. R., Surabhi, V. R., Menias, C. O., Raut, A. A., and Chintapalli, K. N. (2008). Benign renal neoplasms in adults: cross-sectional imaging findings. *AJR Am J Roentgenol*, 190(1):158–64.
- Prud'homme, G. J. (2012). Cancer stem cells and novel targets for antitumor strategies. *Curr Pharm Des*, 18(19):2838–49.

- Prud'homme, G. J., Glinka, Y., Toulina, A., Ace, O., Subramaniam, V., and Jothy, S. (2010). Breast cancer stem-like cells are inhibited by a non-toxic aryl hydrocarbon receptor agonist. *PLoS One*, 5(11):e13831.
- Reim, F., Dombrowski, Y., Ritter, C., Buttman, M., Hausler, S., Ossadnik, M., Krockenberger, M., Beier, D., Beier, C. P., Dietl, J., Becker, J. C., Honig, A., and Wischhusen, J. (2009). Immunoselection of breast and ovarian cancer cells with trastuzumab and natural killer cells: selective escape of cd44high/cd24low/her2low breast cancer stem cells. *Cancer Res*, 69(20):8058–66.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., and Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859):105–11.
- Rini, B. I., Campbell, S. C., and Escudier, B. (2009). Renal cell carcinoma. *Lancet*, 373(9669):1119–32.
- Rodova, M., Fu, J., Watkins, D. N., Srivastava, R. K., and Shankar, S. (2012). Sonic hedgehog signaling inhibition provides opportunities for targeted therapy by sulforaphane in regulating pancreatic cancer stem cell self-renewal. *PLoS One*, 7(9):e46083.
- Rowan, K. (2009). High-throughput screening finds potential killer of cancer stem cells. *J Natl Cancer Inst*, 101(21):1438–9.
- Sacco, E., Pinto, F., Sasso, F., Racioppi, M., Gulino, G., Volpe, A., and Bassi, P. (2009). Paraneoplastic syndromes in patients with urological malignancies. *Urol Int*, 83(1):1–11.
- Sachlos, E., Risueno, R. M., Laronde, S., Shapovalova, Z., Lee, J. H., Russell, J., Malig, M., McNicol, J. D., Fiebig-Comyn, A., Graham, M., Levadoux-Martin, M., Lee, J. B., Giacomelli, A. O., Hassell, J. A., Fischer-Russell, D., Trus, M. R., Foley, R., Leber, B., Xenocostas, A., Brown, E. D., Collins, T. J., and Bhatia, M. (2012). Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells. *Cell*, 149(6):1284–97.
- Scarpa, E. S. and Ninfali, P. (2015). Phytochemicals as innovative therapeutic tools against cancer stem cells. *Int J Mol Sci*, 16(7):15727–42.
- Schutz, F. A., Xie, W., Donskov, F., Sircar, M., McDermott, D. F., Rini, B. I., Agarwal, N., Pal, S. K., Srinivas, S., Kollmannsberger, C., North, S. A., Wood, L. A., Vaishampayan, U., Tan,

- M. H., Mackenzie, M. J., Lee, J. L., Rha, S. Y., Yuasa, T., Heng, D. Y., and Choueiri, T. K. (2014). The impact of low serum sodium on treatment outcome of targeted therapy in metastatic renal cell carcinoma: results from the international metastatic renal cell cancer database consortium. *Eur Urol*, 65(4):723–30.
- Sell, S. (1993). Cellular origin of cancer: dedifferentiation or stem cell maturation arrest? *Environ Health Perspect*, 101 Suppl 5:15–26.
- Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E. R., and Morrison, S. J. (2009). Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell*, 138(5):822–9.
- Sheridan, C., Kishimoto, H., Fuchs, R. K., Mehrotra, S., Bhat-Nakshatri, P., Turner, C. H., Goulet, R. J., Badve, S., and Nakshatri, H. (2006). Cd44+/cd24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res*, 8(5):R59.
- Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., and Jemal, A. (2014). Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*, 64(1):9–29.
- Stepanenko, A. A., Andreieva, S. V., Korets, K. V., Mykytenko, D. O., Baklaushev, V. P., Chekhonin, V. P., and Dmitrenko, V. V. (2016). mtor inhibitor temsirolimus and mek1/2 inhibitor u0126 promote chromosomal instability and cell type-dependent phenotype changes of glioblastoma cells. *Gene*, 579(1):58–68.
- Sternberg, C. N., Davis, I. D., Mardiak, J., Szczylik, C., Lee, E., Wagstaff, J., Barrios, C. H., Salman, P., Gladkov, O. A., Kavina, A., Zarba, J. J., Chen, M., McCann, L., Pandite, L., Roychowdhury, D. F., and Hawkins, R. E. (2010). Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase iii trial. *J Clin Oncol*, 28(6):1061–8.
- Stiles, B., Groszer, M., Wang, S., Jiao, J., and Wu, H. (2004). Ptenless means more. *Dev Biol*, 273(2):175–84.
- Takebe, N., Harris, P. J., Warren, R. Q., and Ivy, S. P. (2011). Targeting cancer stem cells by inhibiting wnt, notch, and hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol*, 8(2):97–106.
- Tang, Q. L., Zhao, Z. Q., Li, J. C., Liang, Y., Yin, J. Q., Zou, C. Y., Xie, X. B., Zeng, Y. X., Shen,

- J. N., Kang, T., and Wang, J. (2011). Salinomycin inhibits osteosarcoma by targeting its tumor stem cells. *Cancer Lett*, 311(1):113–21.
- Tehranchi, R., Woll, P. S., Anderson, K., Buza-Vidas, N., Mizukami, T., Mead, A. J., Astrand-Grundstrom, I., Strombeck, B., Horvat, A., Ferry, H., Dhanda, R. S., Hast, R., Ryden, T., Vyas, P., Gohring, G., Schlegelberger, B., Johansson, B., Hellstrom-Lindberg, E., List, A., Nilsson, L., and Jacobsen, S. E. (2010). Persistent malignant stem cells in del(5q) myelodysplasia in remission. *N Engl J Med*, 363(11):1025–37.
- Todaro, M., Alea, M. P., Di Stefano, A. B., Cammareri, P., Vermeulen, L., Iovino, F., Tripodo, C., Russo, A., Gulotta, G., Medema, J. P., and Stassi, G. (2007). Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell*, 1(4):389–402.
- Tomaszewski, J. J., Uzzo, R. G., and Smaldone, M. C. (2014). Heterogeneity and renal mass biopsy: a review of its role and reliability. *Cancer Biol Med*, 11(3):162–72.
- Tortorella, S. M., Royce, S. G., Licciardi, P. V., and Karagiannis, T. C. (2015). Dietary sulforaphane in cancer chemoprevention: The role of epigenetic regulation and hdac inhibition. *Antioxid Redox Signal*, 22(16):1382–424.
- Vermeulen, L., de Sousa e Melo, F., Richel, D. J., and Medema, J. P. (2012). The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. *Lancet Oncol*, 13(2):e83–9.
- Visvader, J. E. and Lindeman, G. J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*, 8(10):755–68.
- Volpe, A., Finelli, A., Gill, I. S., Jewett, M. A., Martignoni, G., Polascik, T. J., Remzi, M., and Uzzo, R. G. (2012). Rationale for percutaneous biopsy and histologic characterisation of renal tumours. *Eur Urol*, 62(3):491–504.
- Wang, Y. (2011). Effects of salinomycin on cancer stem cell in human lung adenocarcinoma a549 cells. *Med Chem*, 7(2):106–11.
- Weikert, S. and Ljungberg, B. (2010). Contemporary epidemiology of renal cell carcinoma: perspectives of primary prevention. *World J Urol*, 28(3):247–52.

- Weisburger, J. H. (1999). Antimutagens, anticarcinogens, and effective worldwide cancer prevention. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 18(2):85–93.
- Yang, C., Peng, J., Jiang, W., Zhang, Y., Chen, X., Wu, X., Zhu, Y., Zhang, H., Chen, J., Wang, J., Cho, W. C., and Jin, K. (2013). mtor activation in immature cells of primary nasopharyngeal carcinoma and anti-tumor effect of rapamycin in vitro and in vivo. *Cancer Lett*, 341(2):186–94.
- Yang, J. C., Haworth, L., Sherry, R. M., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Steinberg, S. M., Chen, H. X., and Rosenberg, S. A. (2003). A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med*, 349(5):427–34.
- Zanichelli, F., Capasso, S., Cipollaro, M., Pagnotta, E., Carteni, M., Casale, F., Iori, R., and Galderisi, U. (2012). Dose-dependent effects of r-sulforaphane isothiocyanate on the biology of human mesenchymal stem cells, at dietary amounts, it promotes cell proliferation and reduces senescence and apoptosis, while at anti-cancer drug doses, it has a cytotoxic effect. *Age (Dordr)*, 34(2):281–93.
- Zhang, B., Wang, X., Cai, F., Chen, W., Loesch, U., and Zhong, X. Y. (2013). Antitumor properties of salinomycin on cisplatin-resistant human ovarian cancer cells in vitro and in vivo: involvement of p38 mapk activation. *Oncol Rep*, 29(4):1371–8.
- Zhang, G. N., Liang, Y., Zhou, L. J., Chen, S. P., Chen, G., Zhang, T. P., Kang, T., and Zhao, Y. P. (2011). Combination of salinomycin and gemcitabine eliminates pancreatic cancer cells. *Cancer Lett*, 313(2):137–44.
- Zhang, Y., Zhang, H., Wang, X., Wang, J., Zhang, X., and Zhang, Q. (2012). The eradication of breast cancer and cancer stem cells using octreotide modified paclitaxel active targeting micelles and salinomycin passive targeting micelles. *Biomaterials*, 33(2):679–91.
- Zhong, Y., Guan, K., Guo, S., Zhou, C., Wang, D., Ma, W., Zhang, Y., Li, C., and Zhang, S. (2010). Spheres derived from the human sk-rc-42 renal cell carcinoma cell line are enriched in cancer stem cells. *Cancer Lett*, 299(2):150–60.
- Zhou, Y., Zhou, Y., Shingu, T., Feng, L., Chen, Z., Ogasawara, M., Keating, M. J., Kondo, S., and Huang, P. (2011). Metabolic alterations in highly tumorigenic glioblastoma cells:

preference for hypoxia and high dependency on glycolysis. *J Biol Chem*, 286(37):32843–53.

Znaor, A., Lortet-Tieulent, J., Laversanne, M., Jemal, A., and Bray, F. (2015). International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality. *Eur Urol*, 67(3):519–30.

9 Danksagung

An dem guten Gelingen meiner Dissertation waren jede Menge mir nahestehender Menschen beteiligt, denen ich Dank schulde. Der größte Dank gilt meinen Betreuern Heike Pohla und Wolfgang Zimmermann, die mir immer bei Fragen und Problemen zur Seite standen. Sie hatten stets ein offenes Ohr für mich und berieten bei methodischen und theoretischen Angelegenheiten. Ihre Anregungen und Denkanstöße trieben mich in meiner Dissertation vorwärts und förderten meine persönliche Weiterentwicklung. Sie sind die besten Betreuer, die man sich wünschen kann.

Bedanken möchte ich mich auch bei Alexander Buchner, Georg Hennig, Christian Homann und den restlichen Mitarbeitern des LIFE-Zentrums für ihr ständiges Feedback, hilfreiche Tipps und die netten Gespräche. Birgit Stadlbauer und Michael Heide möchte ich dafür danken, dass sie mir geduldig die Methoden der Zellkultur beibrachten und mir bei technischen Problemen zur Seite standen. Mein Dank gilt auch Prof. Jürgen Heesemann und FöFoLe, welche dieses Projekt ermöglicht haben und mich zu diesem Team führten. Ich möchte mich auch bei Gabrielle Strauß, Maximilian Gassenmaier, Dong Chen und den anderen Mitdoktoranden für die vielen netten Gespräche im Labor, die mich dazu ermutigten weiterzumachen, und für die kleinen Tipps bedanken, die die Laborarbeit vereinfachten.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Meinen Eltern danke ich besonders für die moralische sowie finanzielle Unterstützung und dass sie mich immer ermutigten durchzuhalten. Meinem Bruder Phong und Katharina Heinle möchte ich ebenfalls danken, die sich trotz der Fachfremde bereit erklärten, die Arbeit Korrektur zu lesen. Auch bei Josef Ippisch und Felix Kröner möchte ich mich für die technische Unterstützung und die aufbauenden Worte bedanken.