

Aus der Universitätsklinik für Urologie Tübingen

**Prognostische Bedeutung von CD147 beim klarzelligen
Nierenzellkarzinom**

Bewertung der Expression auf Protein- und mRNA-Ebene

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Stühler, Viktoria Regina

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Bedke

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. Dr. M. Müller

Tag der Disputation: 20.06.2017

Widmung

"Die Endlosigkeit des wissenschaftlichen Ringens sorgt unablässig dafür, daß dem forschenden Menscheng Geist seine beiden edelsten Antriebe erhalten bleiben und immer wieder von neuem angefacht werden: Die Begeisterung und die Ehrfurcht."

(Max Planck, deutscher Physiker, *23. April 1858, † 4. Oktober 1947)

Meiner lieben Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Formelverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung.....	1
1.1 Das Nierenzellkarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese.....	2
1.1.3 Klinik und Diagnostik	4
1.1.4 Klassifikation.....	4
1.1.5 Therapie des Nierenzellkarzinoms	6
1.1.6 Prognose des Nierenzellkarzinoms	10
1.2 Cluster of differentiation 147 (CD147).....	12
1.2.1 Entdeckung und Namensgebung	12
1.2.2 CD147 in physiologischen und pathologischen Prozessen	13
1.2.3 Allgemeine Bedeutung der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und deren Induktion durch CD147.....	14
1.2.4 Struktur von CD147 und dessen Bindungspartner	15
1.2.5 CD147 und seine Bedeutung bei der Angiogenese.....	18
1.2.6 Expression von CD147 auf Tumoren.....	19
1.2.7 CD147 und der "Warburg-Effekt".....	20
1.2.8 CD147 als Therapieoption und prognostischer Marker	22
1.3 Fragestellung der Arbeit.....	26
2. Material und Methodik	27
2.1 Tabellarische Material- und Geräteaufzählung.....	27
2.1.1 Zelllinien	27
2.1.2 Small-interfering RNAs (siRNA).....	28
2.1.3 Marker	28
2.1.4 Antikörper	28

2.1.5 Kits	29
2.1.6 Reagenzien, Chemikalien.....	29
2.1.7 Einmalartikel	31
2.1.8 Arbeitsgeräte	32
2.1.9 Softwares	34
2.2 Lösungen, Puffer und Gele	35
2.3 Zellkulturmethoden	38
2.3.1 Allgemeine Zellkulturarbeit	38
2.3.2 Auftauen und Einfrieren der Zellen	38
2.3.3 Passagieren der Zellen.....	39
2.3.4 Bestimmung der Zellzahl mittels Hämocytometers (Neubauer-Zählkammer)	39
2.4 Transfektion von siRNA	41
2.5 Isolierung und Quantifizierung von RNA aus Zellkulturen.....	43
2.5.1 mRNA-Isolierung mittels Kit.....	43
2.5.2 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration und Bestimmung der Qualität mittels Agilent Bioanalyzer	45
2.6 Proteinanalyse mittels Western-Blot	47
2.6.1 Proteinisolierung.....	47
2.6.2 Proteinbestimmung nach Smith in Mikrotiterplatte.....	47
2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	49
2.6.4 Western-Blot-Analyse.....	51
2.7 Patientenkollektiv und Datenerhebung	53
2.7.1 Untersuchungsmaterial.....	54
2.7.2 Tissue Microarray Technik (TMA).....	55
2.7.3 Immunhistochemie	61
2.7.4 Semi-quantitative Auswertung.....	63
2.7.5 Automatisierte Auswertung mit der Software Tissue Studio	64
2.8 Statistische Auswertung.....	67
3. Ergebnis	70
3.1 Patientenkohorten.....	70
3.2 Evaluation der Proteinexpression von CD147.....	73

3.2.1 Resultate der Expression von CD147 im Tumor- und tumorfreien Normalgewebe mittels manueller Auswertung	73
3.2.2 Resultate der Software-basierten Auswertung	77
3.2.3 Proteinexpression von CD147 in der Kohorte 1.....	81
3.2.4 Proteinexpression von CD147 in der Kohorte 3.....	84
3.3 Evaluation der mRNA-Expression von CD147	87
3.3.1 Expressionshöhe der mRNA von CD147 in der Kohorte 3	87
3.3.2 Expressionshöhe der mRNA von CD147 in der Kohorte 2	89
3.4 Resultate der Western-Blot-Analysen	90
3.5 Evaluation von prognostischen Modellen zur Vorhersage des Outcomes bei Patienten mit einem klarzelligem Nierenzellkarzinom	94
4. Diskussion	97
5. Zusammenfassung	110
6. Literaturverzeichnis	113
7. Erklärung zum Eigenanteil.....	123
8. Veröffentlichung	124
9. Danksagung	125
10. Lebenslauf.....	127

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturmodell von CD147	18
Abbildung 2: Apparat für die SDS-PAGE	50
Abbildung 3: Manueller Tissue Microarrayer Model MTA-1	58
Abbildung 4: Tissue Microarrayer Model MTA-1 mit Paraffinblock und HE-Schnitt.....	59
Abbildung 5: Nadelsystem des Manuellen Tissue Microarrayers Model MTA-1 mit einem im Paraffinblock eingebetteten Nierentumorgewebe.....	60
Abbildung 6: Fertiger, gestanzter TMA-Block	60
Abbildung 7: Übersichtsbild eines immunhistochemisch gefärbten TMAs mittels der Software Mirax Viewer	63
Abbildung 8: Übersichtsbild der verwendeten Software Mirax Viewer.....	73
Abbildung 9: Detaillierte Aufnahmen des linken Tumor- und korrespondierenden Normalgewebes aus Abbildung 8 (CD147-AK, Verdünnung 1:5000)	74
Abbildung 10: Detaillierte Aufnahmen des rechten Tumor- und korrespondierenden Normalgewebes aus Abbildung 8 (CD147-AK, Verdünnung 1:5000)	75
Abbildung 11: Repräsentative immunhistochemische Färbungen von CD147 im Tumorgewebe mit niedriger Expression und korrespondierendes tumorfrees Normalgewebe.....	76
Abbildung 12: Beispiel 1 der Software-basierten Auswertung der Proteinexpression von CD147 mit Tissue Studio (Definiens AG)	78
Abbildung 13: Beispiel 2 der Software-basierten Auswertung der Proteinexpression von CD147 mit Tissue Studio (Definiens AG)	79
Abbildung 14: Korrelationsanalyse des manuell berechneten semi-quantitativen Proteinexpressionsscores (CD147 Proteinexpression [%]) mit dem Software-basierten Score generiert mit Tissue Studio (CD147 Score _{TS}).....	80
Abbildung 15: Evaluierung der Proteinexpression von CD147 im Nierentumor- und korrespondierenden tumorfrees Normalgewebe in der Kohorte 1	81
Abbildung 16: Korrelation der Proteinexpression von CD147 in der Kohorte 1 mit dem Tumorstadium bzw. mit dem Auftreten von Metastasen	82
Abbildung 17: Überlebenszeitanalyse in der Kohorte 1	83
Abbildung 18: Evaluierung der Proteinexpression von CD147 im Nierentumor- und dazugehörigen tumorfrees Normalgewebe in der Kohorte 3.....	84
Abbildung 19: Assoziation der Proteinexpression von CD147 in der Kohorte 3 mit dem Tumorstadium bzw. mit dem Auftreten von Metastasen	85
Abbildung 20: Überlebenszeitanalyse in der Kohorte 3	86
Abbildung 21: Relative Höhe der mRNA-Expression von CD147 in der Kohorte 3.....	88
Abbildung 22: Höhe der normalisierten mRNA-Expression von CD147 in der Kohorte 2 (TCGA).....	89
Abbildung 23: Überlebenszeitanalyse in der Kohorte 2	90
Abbildung 24: Repräsentative Western-Blots mit Färbungen für CD147.....	91
Abbildung 25: Repräsentative Western-Blots mit Färbungen für MCT4.....	93

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tumorstadien des Nierenzellkarzinoms nach der 7. Edition der UICC - TNM-2010	5
Tabelle 2: UICC-Stadiengruppierung des Nierenzellkarzinoms nach der Union Internationale Contre le Cancer	6
Tabelle 3: Verwendete Zelllinien	27
Tabelle 4: Verwendete siRNA	28
Tabelle 5: Verwendete Marker	28
Tabelle 6: Verwendete Antikörper	28
Tabelle 7: Verwendete Kits	29
Tabelle 8: Verwendete Chemikalien	29
Tabelle 9: Verwendete Einmalartikel.....	31
Tabelle 10: Verwendete Arbeitsgeräte	32
Tabelle 11: Verwendete Softwares	34
Tabelle 12: Zusammensetzung hergestellter Lösungen	35
Tabelle 13: Zusammensetzung hergestellter Puffer I	35
Tabelle 14: Zusammensetzung hergestellter Puffer II	36
Tabelle 15: Zusammensetzung hergestellter Puffer III	36
Tabelle 16: Zusammensetzung verwendeter Gele für die SDS-PAGE.....	37
Tabelle 17: Bestimmung der vitalen Zellen in der Neubauer-Zählkammer.....	40
Tabelle 18: Inhalt des mirVana™ miRNA Isolation Kits	44
Tabelle 19: Inhalt des Agilent RNA 6000 Nano Kits.....	46
Tabelle 20: Pipettierschema der Eichpunkte.....	48
Tabelle 21: Detaillierte Patientencharakteristika der 3 untersuchten Kohorten.	71
Tabelle 22: Univariate Cox-Regressionsanalyse von potenziellen Prognosefaktoren für das tumorspezifische Überleben.	95
Tabelle 23: Multivariate Cox-Regressionsanalyse von potenziellen Prognosefaktoren für das tumorspezifische Überleben.	96

Formelverzeichnis

Formel 1: Formel zur Berechnung des Tissue-Studio-Score ($Score_{TS}$)	67
--	----

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
ABCG2	ATP-Binding Cassette Transporter G2
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CD147	Cluster of differentiation 147
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CI	Konfidenzintervall
CLS	Cell lines service
CSS	tumorspezifisches Überleben
CT	Computertomographie
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMMPRIN	Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer
EZM	Extrazellulärmatrix
FBS	Fetales bovines Serum
g	Gramm
H ₂ O	Wasser
HE	Hematoxylin und Eosin
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HRP	Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IKP	Institut für Klinische Pharmakologie
Il-2	Interleukin-2
IMDC	International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium
INF- α	Interferon- α

Abkürzung	Bedeutung
kDa	Kilodalton
kNZK	Klarzelliges Nierenzellkarzinom
l	Liter
MCT	Monocarboxylattransporter
MDR-1	Multidrug Resistance Protein-1
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Milimolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
nm	Nanometer
n.s.	Nicht signifikant
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde
siRNA	Small interfering RNA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	TBS mit Tween
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TCSF	Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor
TMA	Tissue Microarray
TNM-Klassifikation	Tumor-Nodus-Metastasen-Klassifikation
u.a.	unter anderem
UICC	Union Internationale Contre le Cancer

Abkürzung	Bedeutung
V	Volt
v.a.	Vor allem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	Von-Hippel-Lindau
xg	x-fache der Erdbeschleunigung
μ l	Microliter
μ M	Micromolar

1. Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Unter den malignen Tumoren der Niere tritt das Nierenzellkarzinom, das früher häufig unter dem Namen Hypernephrom geführt wurde, mit anteilig 90 % am häufigsten auf [1]. Bei den restlichen 10 % der Nierentumore sind u.a. das Urothelkarzinom, Non-Hodgkin-Lymphom, Sarkom sowie im Kindesalter das Nephroblastom, auch unter dem Namen Wilms-Tumor bekannt, zu nennen [2].

Insgesamt machen die Tumoren der Niere einen Anteil von etwa 3 % aller malignen Tumorerkrankungen des Menschen aus. Sie befinden sich an 6. Stelle der häufigsten Tumorerkrankungen bei Männern und an 10. Stelle bei Frauen [2]. Das Nierenzellkarzinom ist zwar somit eher eine seltenere Erkrankung, dennoch ist es nach dem Prostata- und Blasenkarzinom der dritthäufigste Tumor des Urogenitaltrakts und der am häufigsten zum Tode führende urologische Tumor mit einem Beitrag von 2,6 % bei Männern und 2,1 % bei Frauen von allen tumorbedingten Todesfällen in Deutschland [2].

Seit Ende der 1990er Jahre stieg die Inzidenz des Nierenzellkarzinoms weltweit auch europaweit auf mittlerweile etwa 2 % an. Im Jahr 2012 wurde bei rund 84.000 Menschen in Europa ein Nierenzellkarzinom diagnostiziert. Europaweit verstarben im Jahr 2012 34.700 Menschen bedingt durch ein Nierenzellkarzinom [3]. Für das Jahr 2012 sind in Deutschland für Männer 9.500 Neuerkrankungen bei einer standardisierten Erkrankungsrate von 16,9 pro 100.000 Personen bzw. für Frauen 5.530 Neuerkrankungen bei einer standardisierten Erkrankungsrate von 8,0 pro 100.000 Personen aufgetreten [2].

Die Gesamtmortalitätsrate des Nierenzellkarzinoms stieg bis zu den frühen 1990er Jahren europaweit an. Seither zeigt sich vor allem in den westeuropäischen Ländern bei den altersstandardisierten Sterberaten insgesamt eine fallende Tendenz [4]. Im Jahr 2012 betragen in Deutschland die standardisierten Sterberaten 5,1 pro 100.000 Personen für Männer bei einer

Anzahl von 3.125 Sterbefällen und 2,4 pro 100.000 Personen für Frauen bei einer Anzahl von 2.131 Sterbefällen [2].

Das mittlere Erkrankungsalter liegt für das männliche Geschlecht bei 68 Jahren, für das weibliche bei 72 Jahren. Dabei erkranken Männer etwa eineinhalb mal häufiger als Frauen [1, 2].

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Histologisch unterscheidet man das mit einer Häufigkeit von 70 - 80 % auftretende klarzellige Nierenzellkarzinom von den Minderheiten, zu denen das chromophile bzw. papilläre (10 %) und das chromophobe Karzinom (5 %) gerechnet werden. Zu erwähnen ist darüber hinaus noch das in 1 % der Fälle selten auftretende Sammelrohrkarzinom, auch Ductus-Bellini-Karzinom genannt [5-7]. Ausgangszellen für die Tumorentstehung sind beim klarzelligen und papillären Karzinom die Zellen des proximalen Tubulus. Das chromophobe Karzinom leitet sich vom distalen Tubulusepithel ab. Das Ductus-Bellini-Karzinom zeigt eine histologische Abstammung vom Sammelrohrsystem [8].

Zu den anerkannten Risikofaktoren für die Entstehung eines Nierenzellkarzinoms zählen aktives und passives Rauchen [9, 10], Übergewicht und unausgewogene, insbesondere eiweißreiche Ernährung [11-13]. Auch sind das Auftreten einer arteriellen Hypertonie sowie die, bei diesem Krankheitsbild verwendeten antihypertensiven Therapeutika wie Diuretika, aber auch andere Antihypertensiva, mit einem erhöhten Risiko für ein Nierenzellkarzinom behaftet. Fraglich bleibt bisher, ob diese auch als unabhängige Risikofaktoren gewertet werden können oder erst die Kombination zur Entwicklung eines Nierenzellkarzinoms beiträgt [14]. Weitere diskutierte, jedoch nicht zweifelsfrei belegte Risikofaktoren sind eine dauerhafte Analgetikaeinnahme [15, 16] sowie eine berufsbedingte Exposition gegenüber kanzerogenen Stoffen wie z.B. Asbest, Trichlorethylen und Cadmium [17, 18]. Ebenfalls wird angenommen, dass eine terminale Niereninsuffizienz [19, 20] und die erworbenen zystischen Nierenerkrankungen [21] einen Beitrag zur Tumorentstehung leisten können.

Demgegenüber scheint ein moderater Alkoholkonsum aus noch ungeklärten Gründen einen protektiven Effekt zu haben [22].

In den meisten Fällen tritt das Nierenzellkarzinom ohne ein erkennbares erbliches Muster auf. Nur 3 % der Nierenzellkarzinome treten bei Patienten mit hereditären Erkrankungen auf. Zu diesen zählen u.a. die tuberöse Sklerose [23], das Birt-Hogg-Dubé-Syndrom [24] und das von Hippel-Lindau-Syndrom [25-27]. Dem von Hippel-Lindau-Syndrom liegt eine Keimbahnmutation des VHL-Tumorsuppressorgens, das auf Chromosom 3p25-p26 lokalisiert ist, zugrunde [28]. Allerdings lässt sich diese somatische Mutation des VHL-Gens molekularbiologisch auch in bis zu 80 % der sporadischen klarzelligen Nierenzellkarzinome nachweisen [29-31].

Unter normalen Bedingungen, das bedeutet Normoxie und eine normale Funktion des VHL-Gens, kodiert das VHL-Gen das VHL-Protein, das ein Bestandteil des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes ist. Dieser Komplex markiert einen wichtigen Transkriptionsfaktor, nämlich den Hypoxie-induzierten Faktor (HIF), für die Ubiquitinierung und dessen Proteasom-vermittelten Abbau. Im Falle einer zellulären Hypoxie oder eines inaktivierten VHL-Gens wird die Interaktion zwischen VHL-Protein und HIF unterbrochen, die eine Stabilisierung und Akkumulation von HIF bedingt. Das aktive HIF transloziert dann in den Zellkern und führt zur Transkription von verschiedenen Genen, die eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression haben, u.a. VEGF und PDGF [5]. Des Weiteren wird die Expression von Genen vermittelt, die für eine verstärkte Glykolyse in den Tumorzellen benötigt wird. Hierzu siehe im Verlauf Kapitel 1.2.7. Ferner ist anzumerken, dass durch die Mutation des VHL-Gens im klarzelligen Nierenzellkarzinom ein hypoxischer Phänotyp nachgeahmt wird [32]. Diese starke einzigartige Assoziation des klarzelligen Nierenzellkarzinoms mit der Mutation des VHL-Gens und die daraus resultierende Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α sind wichtige Forschungsergebnisse der letzten 20 Jahre.

1.1.3 Klinik und Diagnostik

Früher galt die Symptomtrias aus Flankenschmerz, tastbarem Abdominaltumor und Hämaturie als typisch für das Nierenzellkarzinom, da diese Symptome bei damals oft fortgeschrittener Erkrankung auftraten [33]. Charakteristisch für das Nierenzellkarzinom ist das Fehlen von frühen Warnsymptomen. So weisen Krankheitszeichen wie Gewichtsverlust, Müdigkeit, Anämie und paraneoplastische Syndrome, die bei 30 % der Patienten mit symptomatischem Nierenzellkarzinom auftreten und zu denen u.a. die Polyzythämie, das Fieber unklarer Genese (FUO), die Neuropathie sowie die Hyperkalzämie gezählt werden, auf ein fortgeschrittenes Tumorstadium hin [34].

Heutzutage werden dank des weitverbreiteten Einsatzes der Abdomensonographie sowie CT- und MRT-Untersuchungen bei verschiedensten medizinischen Indikationen mehr als 50 % der Nierenzellkarzinome zufällig im Rahmen dieser Untersuchungen entdeckt. Sie befinden sich meist in einem frühen Stadium mit damit einhergehender besserer Prognose [35-37]. Für zufällig im Rahmen von Schnittbildgebungen entdeckte zystische renale Läsionen kann heutzutage zur Abschätzung des Malignitätsrisikos dieser zystischen Veränderungen in der Niere die Klassifikation nach Bosniak für das CT angewendet werden [38].

1.1.4 Klassifikation

Die auch in dieser Arbeit verwendete allgemein gültige TNM-Klassifikation wurde 1974 von der "Union Internationale Contre le Cancer" (UICC) auch für das Nierenzellkarzinom als internationaler Standard zum Staging festgelegt und unterliegt regelmäßigen Überarbeitungen. Hier wurde die Aktualisierung aus dem Jahr 2010 verwendet. Die Tumorstadien des Nierenzellkarzinoms nach der 7. Edition der UICC- TNM- 2010 sind in Tabelle 1 aufgeführt [39].

Tabelle 1: Tumorstadien des Nierenzellkarzinoms nach der 7. Edition der UICC - TNM-2010

7. Edition des Union Internationale Contre le Cancer/American joint committee on cancer system

<i>T - Tumorgröße</i>	
T1a	Tumor auf Niere begrenzt, Tumor < 4 cm
T1b	Tumor auf Niere begrenzt, Tumor 4 - 7 cm
T2a	Tumor auf Niere begrenzt, Tumor 7 - 10 cm
T2b	Tumor auf Niere begrenzt, Tumor > 10 cm
T3a	Tumor infiltriert perinephritisches Gewebe, Nierensinus oder Nierenvene
T3b	Tumorausdehnung in die Vena cava unterhalb des Zwerchfells
T3c	Tumorausdehnung in die Vena cava oberhalb des Zwerchfells oder Befall der Venenwand auf jeder Ebene
T4	Infiltration über die Gerota-Faszie hinaus oder Ausdehnung in die ipsilaterale Nebenniere
<i>N - Nodus</i>	
N0	Keine Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in einem Lymphknoten
N2	Metastasen in mehreren Lymphknoten
<i>M - Metastasen</i>	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
<i>G - Grading nach Fuhrman</i>	
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert

Tabelle 2: UICC-Stadiengruppierung des Nierenzellkarzinoms nach der Union Internationale Contre le Cancer

UICC-Stadiengruppierung des Nierenzellkarzinoms nach der Union Internationale Contre le Cancer	
Stadium I	T1N0M0
Stadium II	T2N0M0
Stadium III	T3N0M0 oder T1-T3N1M0
Stadium IV	T4 oder N2 oder M1

1.1.5 Therapie des Nierenzellkarzinoms

Operative Therapie

Für das Nierenzellkarzinom im lokalisierten Stadium ist die operative Tumorentfernung der einzige kurative Therapieansatz. Als Goldstandard für kleine Tumormassen hat sich mittlerweile, wenn technisch durchführbar, die partielle Nephrektomie etabliert. Dieses organerhaltende Verfahren führt, verglichen mit Ergebnissen nach Nephrektomie, bei Tumoren bis 4 cm Durchmesser (T1a) zu einem onkologisch gleichwertigen Ergebnis bei gleichzeitig verbesserter Lebensqualität und niedrigerem Risiko für nachfolgende kardiovaskuläre Ereignisse [40-44]. Für Tumorgößen von 4 - 7 cm wurden ebenfalls keine Unterschiede der tumorspezifischen Überlebensrate für die Verfahren der partiellen und radikalen Nephrektomie beobachtet [43]. Die somit empfohlene Therapie für das Nierenzellkarzinom im Stadium T1a - b ist, wenn technisch realisierbar, die partielle Nephrektomie. Bei größeren Tumoren wird die radikale Nephrektomie angewendet [40, 41].

Desweiteren zeigten sich keine Unterschiede bezüglich des onkologischen Outcomes und des progressionsfreien Überlebens im Vergleich der beiden Verfahren der offenen und laparoskopischen Operationstechnik. Dies traf hier sowohl für die partielle als auch radikale Nephrektomie zu [45, 46]. Vorteilhaft bei der Laparoskopie ist ein geringerer Blutverlust, eine kürzere Krankenhausverweildauer, ein geringerer Analgetikagebrauch und eine

insgesamt niedrigere Morbidität, so dass diese zum Standardtherapieverfahren, wenn technisch umsetzbar, werden sollte [43, 45, 46]. Eine neuere Methode ist auch hier die roboterassistierte partielle Nephrektomie. Metaanalysen aus relativ kleinen Patientenkollektiven zeigten hier vergleichbare Ergebnisse für das perioperative und onkologische Outcome [47].

Eine früher als Standard durchgeführte ipsilaterale Adrenalektomie bei radikaler oder partieller Nephrektomie führte zu keinem Überlebensvorteil. Multivariate Analysen zeigten, dass bei in der präoperativen Bildgebung geäußertem Verdacht auf eine Tumordinfiltration der Nebenniere bzw. bei intraoperativ makroskopisch suspektem Nebennierenbefund durch Oberpoltumoren die Indikation zur ipsilateralen Adrenalektomie gestellt werden sollte.

Bei fehlendem klinischen Verdacht auf Lymphknotenmetastasen besteht kein sicherer Hinweis, dass durch eine ipsilaterale Lymphadenektomie das Überleben verbessert wird [1]. Allerdings ist bei klinisch bereits nachgewiesenem positiven Lymphknotenstatus eine Lymphadenektomie immer gerechtfertigt [48].

Nur kurz werden im Folgenden Alternativen zu einer Operation dargestellt. Zur Verfügung stehen ablativ (u.a. die perkutane oder laparoskopische Radiofrequenzablation und die Kryoablation) sowie embolisierende Verfahren, die bis heute aber noch eher experimentellen bzw. palliativen Charakter haben und bei einem eingeschränkten Patientenkollektiv zur Anwendung kommen. Das Patientenkollektiv umfasst u.a. ältere komorbide nicht operationsfähige Patienten, Patienten mit einer genetischen Prädisposition multiple Tumoren zu entwickeln und Patienten mit bilateralen Tumoren oder auch solitären Tumoren, bei denen ein hohes Risiko besteht, dass diese postoperativ ihre Nierenfunktion verlieren [49]. So wurde in einer Studie das Verfahren der partiellen Nephrektomie mit ablativen Verfahren, darunter die Kryoablation und Radiofrequenzablation, bei Patienten mit einem Tumor im Stadium T1a verglichen. In dieser Studie zeigte sich ein zweifach höheres Risiko für ein tumorbedingtes Versterben bei Patienten mit einer Ablation als Therapieverfahren [50]. Jedoch gibt es bis heute noch keine qualitativ ausreichenden Studien, die eine definitive Bewertung der Morbidität und des

onkologischen Outcomes erlauben [50]. Für ältere und komorbide Patienten steht letztendlich auch die Surveillance zur Verfügung [51].

Erwähnenswert bei bereits fortgeschrittener Erkrankung mit Knochen- und Hirnmetastasen ist in Bezug auf eine lokale Symptomverbesserung die Therapieoption der stereotaktischen Radiotherapie [52]. Eher selten wird eine komplette Metastasektomie durchgeführt, die bei gut ausgewählten Patienten ein Benefit mit sich bringt. Für einzelne Patienten im metastasierten Stadium wird eine Tumornephrektomie zur Reduktion der Tumormasse und tumorassozierten Symptome als palliative Therapie empfohlen.

Systemische Therapie

In den letzten zwei Jahrzehnten gehörten IL-2 und INF- α für Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom zur Standardtherapie, ob als alleinige Therapie oder auch als adjuvante systemische Therapieoption nach zytoreduktiver Nephrektomie [53].

In der Ära der Zytokintherapie wurden die "Memorial Sloan-Kettering Cancer Center"-Kriterien (MSKCC-Kriterien), auch Motzer-Kriterien genannt, als Risikomodell erarbeitet. Diese wurden zur Prognoseabschätzung für Patienten mit einem metastasierten Nierenzellkarzinom herangezogen und daran die Entscheidung über die Art der systemischen Therapie abgeleitet [54]. In die Motzer-Kriterien, die auch heute noch Anwendung finden, fließen die Höhe der Laktatdehydrogenase, des Hämoglobinwertes und des Calciums im Blut, der Karnofsky-Index, die Zeitspanne von kleiner ein Jahr von der Erstdiagnose bis zur systemischen Therapie im Rezidiv sowie das Vorhandensein von größer gleich zwei Organmetastasen ein. Abhängig von der Anzahl der Risikofaktoren wurden die Patienten in drei Gruppen mit dem Risiko günstig, mittel und ungünstig kategorisiert [54].

Der erhoffte Erfolg dieser beiden Immuntherapeutika hielt sich jedoch insgesamt betrachtet in Grenzen. So betrug die durchschnittliche Ansprechrate für INF- α 15 % bei einer Ansprechdauer von im Schnitt 4 - 6 Monaten. Allerdings gilt es zu erwähnen, dass einige Phase-III-Studien für INF- α eine

Lebensverlängerung von 3 - 7 Monaten sowie eine Reduktion der Tumorprogression von 25 % zeigten [55] und eine Immuntherapie mit IL-2 in Einzelfällen zu einer andauernden Remission führte [56].

In der letzten Dekade kam es dann zu einem großen Fortschritt im Verständnis der zugrundeliegenden molekularen Biologie des Nierenzellkarzinoms. Dieser führte zur Entwicklung neuer Substanzen. Die sogenannte "Target-Therapie", was übersetzt so viel wie "zielgerichtete Therapie" heißt, entstand. Die Grundlage und somit auch Voraussetzung der "Target-Therapie" in der Onkologie ist die grundsätzliche Abhängigkeit der Tumorzellen von biologischen Stoffwechselwegen, deren Signaltransduktion durch Medikamente gehemmt werden kann und bei denen die Tumorzellen über die Modifikation von Wachstumssignalen im Wachstum gehemmt werden.

Ein hier speziell für das sporadische klarzellige Nierenzellkarzinom kurz anzuführendes Beispiel ist die Akkumulation von HIF durch die Inaktivierung des VHL-Proteins, das bekanntermaßen ein Tumorsuppressor ist. Diese Inaktivierung von HIF ist, wie schon erwähnt, auch in 70 % der sporadischen Nierenzellkarzinome zu finden und führt zu einer Überexprimierung von VEGF und PDGF, die beide die Neoangiogenese begünstigen. Dieser Prozess trägt wesentlich zur Entstehung und zum Fortschreiten des Nierenzellkarzinoms bei [57]. Die Entwicklung neuer Medikamente, die sich u.a. gegen VEGF und seinen Rezeptor richten, begann.

Die Anwendung dieser zielgerichteten Substanzen erfolgt meistens im Rahmen klinischer Studien. Phase-III-Studien etablierten die Multikinaseinhibitoren Sunitinib, Pazopanib und den antiangiogenetischen VEGF-Antikörper Bevacizumab kombiniert mit INF- α als Erstlinien-Therapie für Patienten mit einem behandlungsnaiven metastasierten klarzelligem Nierenzellkarzinom und günstigem bzw. mittlerem Risikoprofil [58, 59]. Im Falle des Vorliegens eines metastasierten Stadiums und eines hohen Risikos bzw. einer ungünstigen Prognose wird die Therapie mit dem mTOR-Inhibitor Temsirolimus empfohlen [60]. Für Patienten, die unter Therapie mit Zytokinen oder Erstlinientherapie einen Progress zeigen, werden Therapeutika zur Zweitlinien-Therapie, wie der

Tyrosinkinaseinhibitor Axitinib, der Multikinaseinhibitor Sorafenib und der mTOR-Inhibitor Everolimus in Phase-II und III-Studien getestet [61].

Im Rahmen der "Target-Therapie" hat die IMDC (International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium) die Motzer-Kriterien für die Auswahl der richtigen Therapie nach Risikostratifizierung abgeändert, indem Neutrophilie und Thrombozytose als Risikofaktoren hinzugefügt und das Kriterium Laktatdehydrogenase entfernt wurden [62].

Schließlich gilt es noch zu erwähnen, dass die Ergebnisse aus randomisierten kontrollierten Studien mit Zytokinen, Chemotherapeutika oder Impfstoffen größtenteils negativ ausfielen [63].

1.1.6 Prognose des Nierenzellkarzinoms

Die Prognose des Nierenzellkarzinoms wird von anatomischen, histologischen, klinischen und molekularen Faktoren beeinflusst [64, 65]. So zeigt sich auf histologischer Ebene eine bessere Prognose für Patienten mit chromophoben versus papillären Typ I versus klarzelligen versus papillären Typ II Nierenzellkarzinom [64, 66].

Neben dem histologischen Subtyp erwiesen sich in Studien u.a. das TNM-Stadium, das Grading, das Alter und Geschlecht, der Karnofsky-Index und klinische Charakteristika wie Kachexie, Thrombozytose, eine hohe Laktatdehydrogenase im Serum, ein niedriger Hämoglobinwert und ein hohes Serumcalcium als prognostische Einflussgrößen [54, 67-69]. Entscheidend für die Prognose des Patienten ist das Vorhandensein einer Fernmetastasierung. Das Stadium der Fernmetastasierung liegt bei etwa 30 % der Patienten schon bei Diagnosestellung vor. Aber auch nach primär kurativer chirurgischer Tumorsektion verbleibt für die Patienten ein beträchtliches Risiko von 20 - 40 % im Verlauf Metastasen zu entwickeln [70]. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt abhängig vom Tumorstadium nach UICC 91 %, 74 %, 67 % und 32 % für die Stadien I, II, III und IV. In Abhängigkeit des Primärtumors wird die 5-Jahres-Überlebensrate wie folgt angegeben: 91 % für T1, 74 % für T2, 67 % für T3 und 32 % für T4 [48].

Da in Deutschland drei viertel aller Nierenzellkarzinome entweder im Stadium T1 oder T2 diagnostiziert werden, ist die gesamt berechnete relative 5-Jahres-Überlebensrate mit 76 % bei Männern und 78 % bei Frauen relativ günstig [2]. Mit der Diagnose einer Metastasierung sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate im Mittel auf 12 - 15 % ohne Therapie und auf 5 - 30 % mit Therapie [71]. Mitverantwortlich hierfür ist die geringe Strahlensensibilität des Nierenzellkarzinoms und dessen Resistenz gegenüber Chemotherapeutika [70, 72]. Die Verfahren der Radio- und Chemotherapie bleiben somit ein palliativer Therapieversuch.

Durch die VEGF-Pathway-Blocker und mTOR-Inhibitoren wurden die Behandlungsoptionen und daraus resultierend das Outcome der Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom drastisch verbessert [73]. Obwohl sich das Gesamtüberleben von Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom folglich in der letzten Dekade verbessert hat, verstirbt immer noch die Mehrzahl der Patienten an dieser Krankheit. Außerdem kann durch diese Therapeutika keine Heilung herbeigeführt werden und nach einem anfänglichen Therapieansprechen folgt doch oft ein Fortschreiten der Erkrankung. Vor diesem Hintergrund geht die Suche nach weiteren therapeutischen "Target-Therapien" weiter. Für ein noch besseres Verständnis der einzigartigen Tumorzellbiologie sollen beispielsweise Analysen des The Cancer Genome Atlas (TCGA) sowie ausgeweitete Untersuchungen zur Interaktion zwischen den Tumorzellen und deren Mikroenvironment weiterhelfen [73].

Des Weiteren scheinen Prognosefaktoren wie Tumorstadium, -grading und -subtyp immer wieder nicht differenziert genug für eine Prognosevorhersage zu sein. In einer Reihe von klinischen Berichten wurde ein relativ variables tumorbiologisches Verhalten des Nierenzellkarzinoms nachgewiesen und die Prognose zwischen Patienten mit demselben Tumorstadium und histologischen Typ oder Differenzierungsgrad war teilweise sehr unterschiedlich [74]. Hoffnung besteht, dass in Zukunft durch neue Analysetechniken, wie beispielsweise die Genexpressionsanalysen, die aktuell verwendeten Prognose- und Risiko-Scores für das metastasierte Nierenzellkarzinom, die sich bislang auf histologische und klinische Faktoren gründen, in der Vorhersagegenauigkeit

verbessert werden könnten [62]. Die Suche nach weiteren möglichen prognostischen Markern, wie beispielsweise HIF- α und VEGF wird also fortgesetzt. Ebenfalls könnte CD147 als ein solcher Marker für das Nierenzellkarzinom oder sogar als "Target-Therapie" interessant sein und auf diese Weise Einfluss auf die Progression dieser Erkrankung nehmen.

1.2 Cluster of differentiation 147 (CD147)

1.2.1 Entdeckung und Namensgebung

Für das Protein "Cluster of differentiation" 147 (CD147) existieren mehrere Bezeichnungen. So ist es auch unter den Namen Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) [75], Basigin [75, 76], M6-Antigen [75, 77], HAb18G [78], OX-47 Antigen bei der Ratte [79], gp42 in Mäusen [76] und das Blut-Hirn-Schranke-(BBB)-spezifische HT7 Molekül beim Huhn, auch Neurothelin genannt [80, 81], bekannt. Bei der Klonierung der cDNA wurde ersichtlich, dass EMMPRIN mit dem humanen Basigin, M6-Antigen und HAb18G übereinstimmt [76-78, 82]. Die gesamte Aminosäuresequenz zwischen CD147 der Ratte und der Maus weist eine Übereinstimmung von 94 %, zwischen CD147 der Maus und des Menschen von 58 % auf. Unterschiede sind vorwiegend in der extrazellulären Domäne zu finden [76, 81]. Diese divergierenden Namen wurden folglich verwendet, um im Ergebnis das gleiche Protein in verschiedenen Ursprungsgeweben und Spezies zu beschreiben [81]. Seit dem 6. Internationalen Workshop und Konferenz des HLDA ("Human Leucocyte Differentiation Antigens") werden nun all diese Homologen unter dem Namen CD147 geführt [83]. Das dazugehörige Gen trägt den Namen Basigin (*BSG*).

In den 1980er Jahren entdeckten Biswas und Kollegen dieses Protein, das auf der Zellmembran von Melanom- und Lungenkarzinomzellen lokalisiert ist und in den umliegenden Fibroblasten und Endothelzellen die Expression von verschiedenen Matrixmetalloproteinasen (MMPs) stimuliert. Sie benannten es seiner Funktion entsprechend als ein von "Tumoren abstammender

Kollagenase Stimulationsfaktor" ("Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor" (TCSF)) [75, 84-87]. Als dann bekannt wurde, dass TCSF auch auf der Oberfläche von normalen nicht-malignen Zellen, z.B. humanen Keratinozyten vorzufinden ist, um auch dort die geweblichen MMPs zu regulieren [75, 88], wurde es 1995 in EMMPRIN ("Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer") umbenannt, um so auf die Rolle dieses Faktors bei der Induktion von extrazellulären MMPs sowohl in physiologischen als auch pathologischen zellulären Interaktionen hinzuweisen [75]. Heute wird dieses Protein mit seinen Homologen meist einheitlich als CD147 bezeichnet [83].

1.2.2 CD147 in physiologischen und pathologischen Prozessen

Zu den physiologischen Prozessen mit Beteiligung von CD147 zählen neben der Regulierung des Endometriums im Menstruationszyklus [89] auch die Induktion von MMPs in der Spermatogenese [90-92] sowie der embryonalen Implantation, Invasion und Differenzierung des Trophoblasten. Der herbeigeführte Verlust von Basigin in Mäusen brachte Defekte in der Spermatogenese und weiblichen Befruchtung mit sich [93]. Darüber hinaus ist CD147 an der embryonalen Entwicklung und Bildung des neuronalen Netzwerks beteiligt. Es konnte hierzu gezeigt werden, dass bei diesen Basigin-Knockout-Mäusen neben der Entwicklung der Retina auch das Lernen und das Gedächtnis gestört waren [94-97]. Weitere Untersuchungen schreiben CD147 eine Rolle bei der Bildung der Blut-Hirn- sowie der Blut-Augen-Schranke zu [81, 98].

Die Induktion der MMPs und der damit verbundene Gewebeumbau erfolgt zudem bei Prozessen wie beispielsweise der Wundheilung [88], der Arteriosklerosis [99, 100] sowie der Herzinsuffizienz [101]. Außerdem ist CD147 an der akuten Gefäßabstoßung nach Herztransplantation [102], der Bildung von Ulzerationen in der Cornea [103] und Prozessen wie dem Lungenversagen [104, 105], der Entstehung von Leberfibrose und -zirrhose [106] sowie der Multiplen Sklerose [107, 108] beteiligt. CD147 wurde zudem als Rezeptor auf den Erythrozyten für PfRh5 ("Plasmodium falciparum reticulocyte binding-like

homologue 5") identifiziert und ist hier essentiell für die Invasion von einigen Stämmen der Plasmodium-Parasiten, darunter auch die Spezies, die beim Menschen Malaria verursachen [109, 110]. Außerdem ist CD147 in pathologischen Prozessen des Bakteriums *Neisseria meningitidis*, das im schlimmsten Fall zum fatalen septischen Schock führen kann, ein entscheidender Host-Rezeptor für die Meningokokken-Pilus-Komponenten PilE und PilV [111]. Ferner kommt CD147 im rheumatologischen Formenkreis eine Bedeutung zu. So spielt CD147 eine Rolle bei Krankheitsbildern wie dem systemischen Lupus erythematoses [112], der Lupus-Nephritis [113] und der rheumatoiden Arthritis [114, 115]. Überdies ist CD147 bei der Aktivierung von Leukozyten bedeutend [77, 79].

Zu den CD147 exprimierenden Zellen gehören Zellen mit hoher metabolischer Aktivität wie u.a. Lymphoblasten, hämatopoetische Zellen, Monozyten, Makrophagen, epitheliale Endothelzellen, Keratinozyten, glatte Muskelzellen und eben Tumorzellen [88, 103, 106].

1.2.3 Allgemeine Bedeutung der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und deren Induktion durch CD147

Um im Folgenden das onkogene Potenzial von CD147 im Zusammenspiel mit den MMPs aufzuzeigen, müssen die Grundlagen der Tumorgenese berücksichtigt werden. Das Missachten und Überwinden von Gewebebarrieren, und hier v.a. der Basalmembran, ist ein entscheidender Schritt bei der Entwicklung vom in situ zum invasiven Tumor. Hierbei ist die Tumorprogression mit beteiligter Tumorinvasion und Metastasierung der am stärksten lebensbedrohliche Aspekt von Tumorerkrankungen. Der Abbau von Bestandteilen der extrazellulären und der interstitiellen Matrix wird von Enzymen, den MMPs, katalysiert [116]. Die MMPs sind eine Klasse von 20 humanen Zink-abhängigen Endopeptidasen [117]. Sie sind funktionell wichtige Proteinasen innerhalb der Tumorentstehung und -progression, da sie den Weg in Richtung Tumorinvasion ebnen.

Es hat sich herausgestellt, dass die MMPs nur zu einem kleinen Anteil von den Tumorzellen selbst produziert werden und der Großteil der MMPs von den

peritumoralen Fibroblasten abgegeben wird [118-121]. Die Regulation der Expression der MMPs in stromalen und epithelialen Zellen wird durch verschiedene lösliche und zellgebundene Faktoren vermittelt. Zu diesen Faktoren gehört ebenfalls das Protein CD147, das sich als weitreichender Modulator bei der Interaktion zwischen Tumorzellen und deren Umgebung (Environment) gezeigt hat [75]. Diese Interaktionen spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Neoplasien [122-124]. Bestärkend hierfür ist zudem, dass CD147 in immunhistochemischen Untersuchungen häufig an der Migrationsfront, also an den Tumorrändern, an denen das invasive Tumorwachstum stattfindet, lokalisiert war [125]. Zudem konnte der Einfluss von CD147 auf die MMPs durch die Beobachtung bestätigt werden, dass eine Überexpression von CD147, egal ob physiologischer oder pathologischer Art, mit einer erhöhten Expression von MMPs verbunden war [126]. Zu den verschiedenen durch CD147 induzierten MMPs gehören die Kollagenase (MMP-1), Gelatinase A (MMP-2), Stromelysin (MMP-3), Gelatinase B (MMP-9), Membran-Typ (MT)1-MMP (MMP-14) und MT2-MMP (MMP-15) [127, 128].

1.2.4 Struktur von CD147 und dessen Bindungspartner

Das für CD147 kodierende Gen ist auf Chromosom 19p13.3 lokalisiert und beinhaltet 1797 Basenpaare [129, 130], die 269 Aminosäuren kodieren. Darunter befinden sich zwei extrazelluläre C2-typische Phospholipid-bindende Ig-Domänen, bestehend aus 185 Aminosäuren [84], eine sich aus 24 Aminosäuren zusammensetzende transmembranöse Region und eine 39 Aminosäuren beinhaltende intrazelluläre C-terminale Region [75, 130]. Das Protein CD147 besitzt die Eigenschaften eines Adhäsionsmoleküls und ist fähig Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Adhäsionen zu vermitteln. Die Besonderheiten der einzelnen Molekülregionen von CD147 sind im Folgenden näher beschrieben.

Mittels der extrazellulären N-terminalen Ig-Domäne formieren sich die CD147-Moleküle, ähnlich wie andere Mitglieder der Ig-Superfamilie, untereinander zu Oligomeren in cis-Konfiguration durch Bildung hydrophober Wechselwirkungen innerhalb dieser N-terminalen Ig-Domäne [131]. Diese homophilen CD147-Interaktionen können durch zwei CD147-Moleküle auf derselben Epithelzelle

miteinander in cis-Form interagieren oder auch als Interaktion zwischen benachbarten Zellen auftreten, was dann wiederum in einer trans-Konfiguration erfolgt. Diese Interaktionen zwischen benachbarten Zellen können homotypisch, d.h. zwischen Tumorzellen und Tumorzellen sowie heterotypisch, also als Interaktion zwischen Tumorzellen und beispielsweise Fibroblasten, auftreten [75]. Mit seiner transmembranösen Domäne ist CD147 in die Plasmamembran eingebaut und interagiert mit einem Rezeptor auf den Fibroblasten über seine extrazelluläre Domäne [132].

Wie schon erwähnt, gliedert sich die extrazelluläre Domäne in zwei Ig-Domänen, die über drei Polysachharidseitenketten verfügen. Diese bestimmen durch posttranslationale Modifikation den Glykosylierungszustand und darüber das Molekulargewicht von CD147 von 28-65 kDa [75, 133]. Auf diese Weise entstehen eine wenig glykosylierte (32-44 kDa) und eine stark glykosylierte (45-65 kDa) Variante [134]. Untersuchungen der letzten Jahre demonstrieren, dass durch diese unterschiedlichen Glykosylierungsstufen die biologische Aktivität von CD147 reguliert wird [134] und die Glykosylierung auch beispielsweise für die Aktivierung der MMPs maßgebend ist [135]. Liegt demnach die extrazelluläre Domäne im hochglykosylierten Zustand vor, kann CD147 die Produktion der MMPs über heterodimere Zellinteraktionen in den geweblichen Fibroblasten und Endothelzellen, ebenso wie in den Tumorzellen selbst, durch homophile Zell-Zell-Interaktionen induzieren [135-137]. Für reines deglykosyliertes CD147 wurde nachgewiesen, dass es keine MMP-Aktivität induziert, sondern sogar der Aktivität des glykosylierten CD147 entgegenwirkt [127, 135]. Für die homophilen Bindungen der CD147 Moleküle ist deren Glykosylierung nicht erforderlich [135].

Bemerkenswert ist, dass CD147 nicht nur einen die Tumorprogression fördernden Effekt hat. Es kann durch Interaktionen mit anderen Proteinen zudem einen suppressiven Effekt auf Tumoren haben. Die zweite extrazelluläre Ig-Domäne von CD147 ist mit Caveolin-1 assoziiert, dem Integralmembranprotein der Caveolae, kleinen Einbuchtungen auf der Zelloberfläche [138]. Caveolin-1 bindet dabei selektiv an wenig glykosyliertes CD147 und verhindert dessen posttranslationale Glykosylierung zu stark

glykosyliertem CD147 mit daraus folgender Hemmung der Aktivität von CD147 und deren Bindung untereinander. Dies bedingt im Ergebnis eine Hemmung der MMP-induzierenden Funktion von CD147 [138].

Die transmembranösen und zytoplasmatischen Domänen ermöglichen überdies Interaktionen mit anderen Proteinen, darunter Integrine und Cyclophiline. Auf diese Weise wird eine Signalweiterleitung ins Innere der Zelle und ebenso Interaktionen mit intrazellulären Proteinen gewährleistet [139]. Die transmembranöse Domäne von CD147 weist als Besonderheit eine in der Mitte anzutreffende positiv geladene Aminosäure (Glutaminsäure) auf, wodurch es CD147 ermöglicht wird, mit anderen Transmembranproteinen einen Komplex zu bilden, bei dem die Ladung in einen energetisch stabilen Zustand überführt wird [140]. Auf diese Weise werden Wechselwirkungen von CD147 mit zum Beispiel Cyclophilinen [141] und MCT1-4 [142] erklärt.

CD147 kann neben der membrangebundenen Form auch in löslicher Form vorliegen [136, 143, 144]. Es hat sich gezeigt, dass auch die lösliche Form von CD147 funktionell aktiv ist, da auch in Stromazellen, die in keinem direkten Kontakt mit CD147-exprimierenden Tumorzellen standen, die MMPs hochreguliert wurden [145]. Als weitere Mechanismen für die Aktivierung der MMPs gelten die proteolytische Abspaltung des CD147 von der Plasmamembran und das Abschnüren CD147-tragender Mikrovesikel, die dann nach Freisetzung degradiert werden und so freies zirkulierendes CD147 abgeben [145, 146]. Eine Interaktion mit zellgebundenem CD147 kann daher ebenso mit sekretierten, löslichen Proteinen oder in Membranvesikeln, die von der Zelle abgeschnürt werden, stattfinden.

CD147 hat noch weitere Bindungspartner. Über die Interaktion von CD147 mit Integrinen nimmt CD147 Einfluss auf die Zell-Adhäsion, Angiogenese, Signaltransduktion, Chemotaxis und Proliferation. Integrine sind eine Gruppe von Membranproteinen, die wesentlich zur Herstellung einer Verbindung zwischen Zellen und der EZM beitragen, indem externe Stimuli über Signalkaskaden internalisiert werden [147].

Zudem vermittelt CD147 die membranöse Expression von MCT1 und MCT4 [148-150], worauf im Laufe der Einleitung noch weiter eingegangen wird.

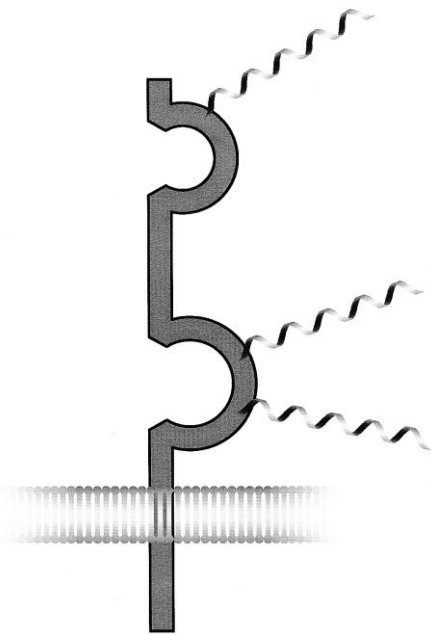


Abbildung 1: Strukturmodel von CD147

*Die schleifigen Anteile entsprechen den beiden Ig-Domänen.
 Die 3 Oligosaccharidseitenketten werden durch die Helices dargestellt.
 Die Abbildung wurde aus dem Paper (Muramatsu et al, 2003) [140] übernommen.*

1.2.5 CD147 und seine Bedeutung bei der Angiogenese

Ein weiterer zentraler Aspekt für die Tumorgenese und das Wachstumsvermögen des Primärtumors bzw. dessen gebildeten Metastasen ist deren Abhängigkeit von der Angiogenese, d.h. von der Neubildung von Blutgefäßen, für die wiederum der Abbau der EZM erforderlich ist [151]. Hierfür sind erneut die MMP-9 sowie VEGF essentiell, die von verschiedenen Mediatoren aus dem Microenvironment, darunter Hypoxie, TNF α und CD147, induziert werden. Für den kritischen Schritt der Tumorangiogenese stellt VEGF ein Schlüsselzytokin dar, da es das Auswachsen von Endothelzellen aus bereits vorhandenen Kapillargefäßen und deren Migration vermittelt. Bei vielen soliden Tumoren geschieht die Induktion von VEGF durch homophile CD147-CD147 Interaktionen zwischen den Tumorzellen und Fibroblasten bzw. Endothelzellen mit der Folge, dass VEGF und MMPs exprimiert werden und so die Angiogenese und Tumorinvasion verstärkt wird [149, 152, 153]. Hierbei

induziert CD147 die Produktion von VEGF auf Protein- und mRNA-Ebene [152]. Diese CD147 vermittelte Regulation der VEGF-Produktion erfolgt über den PI3K-Akt Signalweg [152]. In verschiedenen Tumorarten konnte eine Korrelation der Expression von VEGF mit der Dichte der Mikrovaskularisation und Metastasierung beobachtet werden [154, 155]. Charakteristisch für das klarzellige Nierenzellkarzinom ist eben solch eine reiche Neovaskularisation und ein meist prominentes vaskuläres Netzwerk um die Tumorzellen [156]. Eine Herunterregulierung der Expression von CD147 führt über eine Inhibierung der VEGF-Expression zu einer verminderten Dichte der Mikrovaskularisation sowie zur Suppression des Tumorwachstums in Zelllinien sowie Tierversuchen an Mäusen [152]. CD147 hat zusätzlich auch alleinige direkte proangiogenetische Effekte auf Endothelzellen [157].

Marieb et al. zeigten darüber hinaus, dass CD147 auch die Expression von Hyaluronsäure herbeiführen kann. Diese befähigt die Zellen zur Entwicklung einer Resistenz gegenüber verschiedenen Therapeutika und führt zusätzlich zu deren beschleunigtem Wachstum [158].

Neben der Induktion von VEGF und Hyaluronsäure spielt CD147, wie bereits erwähnt, auch für die MMP-vermittelte Degradierung der Basalmembran und der Umgestaltung der EZM eine essentielle Rolle. Diese Veränderungen sind eine Voraussetzung für die Migration von Endothelzellen [159].

1.2.6 Expression von CD147 auf Tumoren

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass CD147 reichlich auf der Membranoberfläche von verschiedenen Tumoren exprimiert ist und dass diese Überexpression, verglichen mit dem dazugehörigen Normalgewebe, mit einer Vielzahl von biologischen Funktionen, die die Tumorprogression, -invasion und Metastasierung vermitteln, korreliert [160].

Eine Verbindung zwischen einer erhöhten Expression von CD147 und der Tumorprogression wurde u.a. für das Mammakarzinom [125, 146], Ovarialkarzinom [161, 162], Uteruskarzinom [163], Zervixkarzinom [164, 165], Bronchialkarzinom [125, 146], orales Plattenepithelkarzinom [144],

Ösophaguskarzinom [166], Plattenepithelkarzinom der Haut [167], Melanom [127], maligne Lymphom [168], Astrozytom [169], Kolonkarzinom [170], hepatozelluläres Karzinom [171], Harnblasenkarzinom [172] und das Prostatakarzinom [173] gezeigt.

Die erhöhte Expression von CD147 korrelierte hier oftmals nicht nur positiv mit der Tumorprogression, sondern auch mit dem klinisch-pathologischen Stadium [127, 144, 173, 174].

Jin et al. deckten im Jahr 2006 erstmals auf, dass CD147 auch beim Nierenzellkarzinom überexprimiert ist, wobei das normale Nierengewebe nur eine schwache Expression für CD147 in immunhistochemischen Studien zeigte [175].

1.2.7 CD147 und der "Warburg-Effekt"

Zum Verständnis ist es an dieser Stelle wichtig, die in den Tumoren ablaufenden molekularen Vorgänge detaillierter zu beschreiben. Ein wesentliches Merkmal von malignen Zellen ist deren veränderter Energiemetabolismus, die "aerobe Glykolyse" auch in Anwesenheit von Sauerstoff. Auf diese Weise kommen die Tumorzellen ihrem hohen Energiebedarf nach, was schlussendlich in einem selektiven Vorteil der Tumorzellen resultiert [150]. Bekannt ist dieses Phänomen auch unter dem Namen "Warburg-Effekt", benannt nach dem Erstbeschreiber Otto Warburg im Jahr 1924 [176-178]. Hierbei zeigen die Tumorzellen, trotz Anwesenheit von Sauerstoff, einen erhöhten Verbrauch von Glukose und eine damit verbundene hohe Produktionsrate an Laktat als Endprodukt der Glykolyse. Um den durch zelluläre Azidose drohenden Zelltod zu vermeiden, kommt es in den Tumorzellen konsequenterweise zur Hochregulierung von verschiedenen Proteinen, die an einem Export von Protonen aus der Zelle beteiligt sind, wie u.a. die MCTs [161, 179-181]. Die durch den Laktat-Efflux resultierende Azidose im Microenvironment unterstützt ebenfalls die Proliferation und Invasion der Tumorzellen durch eine Behinderung der antitumoralen Aktivität von immunologischen Zellen [149].

CD147 dient hier als wichtiges Chaperon zur Anordnung und richtigen Funktionsweise von MCT1 und MCT4 in der Zellmembran. Dies geschieht durch Komplexbildung. In jüngster Zeit wurde hierzu der Nachweis erbracht, dass CD147 mit MCT1 und MCT4 in derselben Region von Zellen kolokalisiert ist [149]. Dies wird auch durch Beobachtungen von *Kirk et al.* unterstützt, die in CD147-transfizierten Zellen eine Akkumulation von MCT im perinukleären Kompartiment beschrieben, wohingegen eine Kotransfektion mit CD147 eine Expression von aktivem MCT1 und MCT4 an der Plasmamembran ermöglichte. Daraus schlossen sie, dass durch CD147 die richtige Expression von MCT1 und MCT4 in der Zellmembran gewährleistet wird [148]. Auf diese Weise könnte CD147 einen Beitrag zum "Warburg-Effekt" leisten [148]. Dabei führt eine erhöhte Stärke des "Warburg Effekts" zum Tumorwachstum und zur Ausbreitung von Metastasen und ist mit einem schlechteren Outcome bei Tumoren assoziiert [177].

Diese beiden spezifischen Mitglieder der MCT-Familie MCT1 und MCT4 katalysieren demgemäß den Protonen-gekoppelten Transport von Monocarboxylaten wie Pyruvat, Laktat und Ketonkörpern über die Zellmembran [148]. Auf diese Weise wird die sonst durch Laktatansammlung folgende zelluläre Azidose der Tumorzellen verhindert und dadurch deren Überleben garantiert [179, 181].

Solch eine Überexpression von MCT1 und MCT4 wurde für viele solide Tumoren nachgewiesen [149]. Für das klarzellige Nierenzellkarzinom wurde diese Überexpression von MCT4, verglichen mit dem normalen Nierengewebe, ebenfalls gezeigt. Dabei korrelierte diese signifikant mit den klinisch-pathologischen Charakteristika und dem tumorbedingten Versterben [182].

Des Weiteren konnte mittels hyperpolarisierter ¹³C-Pyruvat-Kernspinresonanzspektroskopie in lebenden Nierenzellkarzinomzellen nachgewiesen werden, dass metastasierte Nierenzellkarzinomzellen eine höherer Effluxrate von Laktat aus den Zellen hatten. Diese ist entscheidend, um die hohe Glykolyserate aufrechtzuerhalten und wird durch eine erhöhte Expression von MCT4 herbeigeführt [183]. *Gerlinger et al.* konnten in einer siRNA-Screeningstudie nachweisen, dass das Abschalten von MCT4 auf

Genebene in klarzelligen Nierenzellkarzinomzellen dem "Warburg-Effekt" durch Herbeiführen einer intrazellulären Azidose und einer verminderten ATP-Produktion entgegenwirken und so einen Einfluss auf die Zellproliferation und die Apoptose nehmen könnte [184].

Da MCT1 und MCT4 somit eine Schlüsselrolle bei der Tumormetabolisierung haben, könnten sie auch attraktive Targets in der Tumorthherapie darstellen [149]. Interessanterweise haben Patienten, die mit einem Statin behandelt werden, das nebenbei einen hemmenden Effekt auf MCT4 aufweist [185], ein niedrigeres Risiko, ein Nierenzellkarzinom zu entwickeln [186]. Demnach könnte die Entwicklung eines MCT4-spezifischen Inhibitors ein vielversprechender therapeutischer Ansatz für die Behandlung vieler Tumortypen, darunter auch das Nierenzellkarzinom, sein. Bisher wird jedoch erst der oral verabreichte MCT1-Inhibitor AZD3965 in einer klinischen Phase I/II-Studie für die Behandlung von fortgeschrittenen soliden Tumoren getestet [149].

1.2.8 CD147 als Therapieoption und prognostischer Marker

Durch seine vielseitigen Funktionen bei der Tumorgenese und -progression und der vorhandenen Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern könnte CD147 bei einigen malignen Tumortypen als potenzieller prognostischer Marker für das Outcome von Patienten und als attraktives Target für die antitumorale Therapie in Frage kommen [107, 139].

Wenn nun zwei Tatsachen berücksichtigt werden, nämlich erstens, dass die meisten soliden Tumoren ein hypoxisches Microenvironment haben und HIF-1 in vielen hypoxischen Tumoren stark exprimiert ist und zweitens, dass eine funktionelle Assoziation zwischen CD147 und MCT4 vorliegt, besteht die Vermutung, dass Hypoxie der Auslöser für die Überexpression von CD147 und den glykolytischen Phänotyp vieler Tumoren ist. Unterstützt wird diese Hypothese einerseits durch die Entdeckung in Studien, dass die Expression von CD147 unter ischämischen Bedingungen beispielsweise in neuronalen und kardialen Zellen hochreguliert ist [187, 188] und andererseits durch das

Vorhandensein von zwei HIF-Bindungsstellen im CD147-Gen [180]. Versuche mit Zelllinien zeigten, dass die Expression von CD147 auf mRNA- und Proteinebene unter hypoxischen Bedingungen signifikant hochreguliert wurde [179]. Die Ergebnisse aus Zelllinien unterstützen also die These, dass HIF-1 die Expression von CD147 durch direkte Bindung in der Promoterregion hochregulieren kann und CD147 somit als Hypoxie-responsives Molekül dient, das in einer zeit- und dosisabhängigen Weise durch Hypoxie induziert wird [179]. Für das klarzellige Nierenzellkarzinom gilt es noch speziell zu bedenken, dass es in Folge der Mutation des VHL-Gens zu einem Überangebot von aktivem HIF kommt [5] und dieses wiederum Einfluss auf die Expression von CD147 nehmen kann.

Ferner wurde veranschaulicht, dass HIF-1 α über eine Bindung an die beiden Hypoxie-responsiven Elemente im Promoter von MCT4 zu einer Überexpression von MCT4 führte [189]. In HeLa-Zelllinien, die sich vom Zervixkarzinom ableiten, konnte hier der Nachweis erbracht werden, dass eine Überexprimierung von MCT4 durch HIF-1 α induziert werden kann [189].

Vergangenen Studien haben nachgewiesen, dass die durch CD147 induzierten MMPs und das VEGF sowie die zusätzlich stimulierte Produktion von Hyaluronsäure [190] für die Tumorangiose und das verankerungsunabhängige Wachstumsverhalten der Tumorzellen sowie für die Entwicklung einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und die damit insgesamt schlechtere Prognose mitverantwortlich sind [191]. In Berichten wurde herausgearbeitet, dass diese Resistenz gegenüber Chemotherapeutika durch einige Proteine vermittelt wird, darunter den "ATP-binding cassette transporter G2" (ABCG2) und EGFR. Der ABCG2-vermittelte Transport der zytotoxischen Substanz Methotrexat aus den Immunzellen wird beispielsweise durch CD147 reguliert [192]. Bis heute ist dieser Mechanismus jedoch nur schlecht erforscht.

Beobachtungen aus Zelllinien zeigten, dass eine Behandlung mit einem CD147 neutralisierenden Antikörper zu einer reduzierten Expression von VEGF und MMP-9 und daraus folgender erniedrigter Invasivität führte und CD147 somit ein mögliches interessantes therapeutisches Target sein könnte [193].

Weiterhin führte eine Behandlung von Zelllinien mit CD147-spezifischer RNA-Interferenz zu einer verminderten Tumorgenität und Metastasierung und erhöhte darüber hinaus deren Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika. Dieser Effekt trat u.a. bei Zellen von humanen Lymphomen, oralen Plattenepithel-, Prostata- und Blasenkarzinomen auf [194-196]. Überdies wurde bei der Zelllinie HO-8910pm (humane Ovarialkarzinomzellen) die Genexpression von CD147 mittels RNA-Interferenzen blockiert. Der Knockdown hatte eine Abnahme der Invasionsaktivität der Zellen in vitro sowie eine Abnahme der Tumorgenität in Nacktmäusen zur Folge. Außerdem wurde hier durch die Unterdrückung der Expression von CD147 eine Erhöhung der Sensibilität der Zellen gegenüber Paclitaxel erreicht [197]. Eine ähnliche Beobachtung wurde in Blasentumorzellen gemacht. Hier führte die in vitro Unterdrückung von CD147 zu einer Hemmung der Proliferation, Migration und Invasion der Zellen [149]. Daneben wurde ebenso beim Prostatakarzinom beobachtet, dass eine selektive Hemmung von CD147 in Zelllinien alleine oder in Kombination mit Docetaxel die Metastasierung begrenzte und die Chemosensibilität erhöhte [198]. Weiterhin führte die Behandlung mit einem Antikörper gegen CD147 zu einer verzögerten Tumorbildung in Tiermodellen [199]. Ferner wurde in vergangenen Studien gezeigt, dass das Ausschalten von CD147 zu einer Abnahme der Glykolyserate und der Ausschleusung von Laktat in Tumorzelllinien führte [200].

In einer ersten klinischen Phase I/II-Studie wurde ein gegen CD147 gerichteter Antikörper bei Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom angewendet. Hierdurch konnte eine Größenabnahme der Metastasen bei 27 % der Patienten erreicht werden und eine weitere Tumorprogression bei 58 % der Patienten verhindert werden [201].

Darüber hinaus wurde in experimentellen Modellen gezeigt, dass Therapeutika, die entweder CD147 oder die Cyclophilin-Aktivität beeinflussten, zu signifikanten antiinflammatorischen Effekten führten. Dies könnte zu neuen Behandlungsmöglichkeiten für einige inflammatorische Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, Psoriasis und dem Asthma führen, aber auch beispielsweise Einfluss auf Prozesse wie die Atherosklerose nehmen [153].

Zudem wurde CD147 bereits als prognostischer Marker u.a. beim Endometriumkarzinom [163], Magenkarzinom [202], Glioblastom [203], hepatozellulärem Karzinom [171], nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom [204] sowie Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx [205] vorgeschlagen, da hier eine hohe Expression von CD147 mit einer schlechteren Prognose assoziiert war. Andererseits könnte eine niedrige Expression von CD147 ein Prädiktor für eine günstige Prognose sein.

1.3 Fragestellung der Arbeit

In einer Reihe von klinischen Berichten wurde aufgezeigt, dass das biologische Verhalten und die Prognose von Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom trotz gleichem Tumorstadium, histologischem Subtyp oder Differenzierungsgrad sehr unterschiedlich sein kann [74]. Die aktuell angewendeten Prognose-Scores sind demnach zu ungenau in der Vorhersage und die Suche nach neuen Biomarkern zur Abschätzung des malignen Potenzials des klarzelligen Nierenkarzinoms ist zunehmend wichtig.

Da CD147 in einem Großteil aller bislang untersuchten Tumorentitäten exprimiert wird [206] und eine erhöhte Expression von CD147 mit den Vorgängen der Tumorprogression und Metastasierung korreliert [199], wird CD147 eine Schlüsselrolle bei der Tumorgenese zugewiesen. Für das Nierenzellkarzinom waren die Daten zur Bewertung des prognostischen Potenzials von CD147 und dessen epigenetische Regulation bisher limitiert [156, 207]. Weiterhin könnte CD147 auch als Zielstruktur der "Target-Therapie" interessant sein und auf diese Weise Einfluss auf die Progression dieser Erkrankung haben.

In dieser Arbeit wurde die prognostische Bedeutung von CD147 beim klarzelligen Nierenzellkarzinom bewertet, indem TMAs mit Proben von einem Patientenkollektiv, bestehend aus 245 Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom, hergestellt und an diesen die Expression von CD147 auf Proteinebene mittels immunhistochemischer Färbung ermittelt wurde. Ebenfalls erfolgte eine Auswertung der Expression von CD147 auf mRNA-Ebene.

Im Anschluss wurde die Expressionsstärke von CD147 auf Protein- sowie mRNA-Ebene mit den klinisch-pathologischen Charakteristika und dem Überleben der Patienten korreliert und auf diese Weise die prognostische Bedeutung der Expression von CD147 herausgearbeitet. Die Bewertung erfolgte hierbei im Vergleich zur Expression und Vorhersagewahrscheinlichkeit von MCT4.

Um ein hohes Maß an Standardisierung und Objektivierung bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen zu erhalten, wurde zur Auswertung das Software-basierte System Tissue Studio v.3.6 (Definiens AG) gewählt.

2. Material und Methodik

2.1 Tabellarische Material- und Geräteauflistung

2.1.1 Zelllinien

Tabelle 3: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Tumorart- Zelltyp	Kulturbedingungen	Herkunft
A-498	Epitheliales humanes Nierenzelladenokarzinom	Brutschrank, 37°C, 5% CO ₂ , wassergesättigte Atmosphäre, EMEM-Medium <u>Zusätze:</u> 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat, 1% MEM NEAA, 10% FBS	CLS ("Cell Lines Service", Eppelheim, Deutschland)
786-O	Epitheliales humanes klarzelliges Nierenzelladenokarzinom	Brutschrank, 37°C, 5% CO ₂ , wassergesättigte Atmosphäre, DMEM F-12-Medium <u>Zusätze:</u> 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat, 10% FBS	CLS ("Cell Lines Service", Eppelheim, Deutschland)
Caki-1	Epitheliales humanes klarzelliges Nierenzelladenokarzinom	Brutschrank, 37°C, 5% CO ₂ , wassergesättigte Atmosphäre, Mc Coy's 5a-Medium <u>Zusätze:</u> 50 µg/ml Gentamycin, 10% FBS	CLS ("Cell Lines Service", Eppelheim, Deutschland)
Caki-2	Epitheliales humanes klarzelliges Nierenzelladenokarzinom	Siehe Caki-1	ECACC ("European Collection of Cell Cultures", Salisbury, United Kingdom)

2.1.2 Small-interfering RNAs (siRNA)

Tabelle 4: Verwendete siRNA

Small-interfering RNAs (siRNA)	Hersteller
siGENOME SMARTpool - human BSG	Thermo Scientific, Lafayette, USA
siGENOME non-targeting siRNA pool #1	Thermo Scientific, Lafayette, USA

2.1.3 Marker

Tabelle 5: Verwendete Marker

Marker	Hersteller
Prestained Molecular Weight Marker	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2.1.4 Antikörper

Tabelle 6: Verwendete Antikörper

Antikörper	Ursprung	Hersteller
Primärantikörper:		
CD147 (ab78106)	Maus	Abcam®, Cambridge, United Kingdom
MCT4 (H-90)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
β-Aktin	Maus	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Sekundärantikörper:		
HRP-gekoppelt Anti-Maus	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
HRP-gekoppelt Anti-Kaninchen	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA

2.1.5 Kits

Tabelle 7: Verwendete Kits

Kits	Hersteller
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, California, USA
Ambion® mirVana™ miRNA Isolation Kit	Life technologies, California, USA
Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
<u>Enthalten:</u>	
Dako REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse (ENV)	
Dako REAL™ DAB+ Chromogen	
Dako REAL™ Substrate Buffer	

2.1.6 Reagenzien, Chemikalien

Tabelle 8: Verwendete Chemikalien

Reagenzien	Hersteller
Acrylamid/Bis (30%)	BIO-RAD, California, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bicinchoninic Acid Solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Biowhittaker™ DMEM F-12	Lonza, Verviers, Belgien
Biowhittaker™ EMEM	Lonza, Verviers, Belgien
Biowhittaker™ L-Glutamine	Lonza, Verviers, Belgien
Biowhittaker™ PBS	Lonza, Verviers, Belgien
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
100x BSA (Bovines Serumalbumin)	New England Biolabs, Ipswich, USA
DharmaFECT™ Transfection Reagent I	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland

Reagenzien	Hersteller
Gibco® FBS (Fetales bovines Serum)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Gibco® Gentamicin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Gibco® McCoy's 5A Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Gibco® MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Gibco® Opti-MEM® I Reduced Serum Medium GlutaMAX™ Supplement	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Gibco® Sodium Pyruvate	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Gibco® StemPro® Accutase® Cell Dissociation Reagent	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Hämalaun	Merck, Darmstadt, Deutschland
HCl (Hydrogenchlorid)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hematoxylin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol 70%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
4% Kupfer-II-Sulfat-Pentahydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Microclear	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (Monohydrat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (Dihydrat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pefablock® SC	Biomol, Hamburg, Deutschland
Peroxidase block	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Phenolchloroform	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Protease Inhibitor (PIC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Reagenzien	Hersteller
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNase freies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland,
RNaseZAP®	Life technologies, California, USA
Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate	Pierce, Rockford, USA
Target Retrieval Solution (pH 6)	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
TEMED (N,N,N',N' Tetramethylethylenediamin)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Biochrom, Berlin, Deutschland
Tween20 (50%)	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.7 Einmalartikel

Tabelle 9: Verwendete Einmalartikel

Einmalartikel	Hersteller
Amersham™ Protan™ 0,45 µm Nitrocellulose Blotting Membrane	GE Healthcare, Buckinghamshire, England
Axygen® assay plate 96-well	Corning Incorporated, Corning, USA
Corning® Costar® Stripette® serological pipettes 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning Incorporated, Corning, USA
Cryo Tube™ Vials	Thermo Scientific, Waltham, USA
Deckglas	VWR, Radnor, USA
Eppendorfgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Lysing Matrix D, 2 ml Gefäß	MP Biomedicals, California, USA
Whatman Filterpapier	VWR, Radnor, USA
96 well Mikrotiterplatte (unsteril)	Greiner Bio-one, Nürtingen, Deutschland

Einmalartikel	Hersteller
Objektträger (Super Frost® Plus)	R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellkulturflaschen (Nunc™ Cell Culture Flask T-25, T-75)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zellschaber (Falcon® cell scraper)	Corning Incorporated, Corning, USA
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.1.8 Arbeitsgeräte

Tabelle 10: Verwendete Arbeitsgeräte

Arbeitsgeräte	Hersteller
Agilent Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, California, USA
Begasungsbrutschrank New Brunswick™	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Galaxy 170 CO ₂ Incubator	
Biorad Mini-Protean® Tetra system	Biorad, California, USA
<u>Enthalten:</u>	
Gießkammer (mit Glasscheiben und Kamm)	
und	
Minigel-Elektrophoresekammern	
Biorad Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	Biorad, California, USA
<u>Enthalten:</u>	
Transferkammer und Transferkassette	
CCD Camera Stella	Raytest, Straubenhardt, Deutschland
FastPrep-24-Homogenizer	MP Biomedicals, California, USA
Lichtmikroskop Olympus CKX31	Olympus, Hamburg, Deutschland
Manuellen Tissue Microarrays Model MTA-1	Beecher Instruments, Sun Prairie, USA
<u>Enthalten:</u>	
<ul style="list-style-type: none"> • Manual Beecher Tissue Arrayer • Gewebestanzzylinder, Größe 0,6mm • Stoppvorrichtung für die Tiefe, 2mm 	

Arbeitsgeräte	Hersteller
A35-Microtome Blade (pfmmedical)	Feather, Japan
Mikrotom (RM 2255)	Leica, Nussloch, Deutschland
Milli-Q Gradient	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Mirax Scanner	Carl Zeiss, Micro-Imaging, Göttingen, Deutschland
Nalgene Cryo1° Freezing Container	Thermo Scientific, Waltham, USA
Neubauer-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetboy	INTEGRA Biosciences, Zizers, Schweiz
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plate Shaker Titramax 100	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
PowerPac™ Basic Power Supply	BIO-RAD, California, USA
Rotilabo® Mini Centrifuge	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rüttler	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
Spektralphotometer NanoDrop 2000c™	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Stella 3200 Imaging System	Raytest, Straubenhardt, Deutschland
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trockenschrank, Heraeus instruments, Function line	Thermo Scientific, Waltham, USA
Ultrasonic Homogenizer Sonoplus HD 200	Bandelin, Berlin, Deutschland
Veriti® 96-/384-well Thermal Cycler	Life technologies, California, USA
Victor Elisa Reader wallac multilab counter 1420	PerkinElmer, Waltham, USA
Vortexer Lab Dancer	IKA® Werke, Staufen, Deutschland
Vortexer Reax Top	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Werkbank (Laminar-flow Sicherheitswerkbank)	Weiss Pharmatechnik, Hude, Deutschland
Zentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Rotina 380 R	Andreas Hettich, Tuttlingen, Deutschland

2.1.9 Softwares

Tabelle 11: Verwendete Softwares

Software	Hersteller
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent technologies, Waldbronn, Deutschland
AIDA (Advanced Image Data Analyzer), Version 450	Raytest, Straubenhardt, Deutschland
Microsoft Office	Microsoft corporation, Washington, USA
Mirax Viewer	Carl Zeiss, Micro-Imaging, Göttingen, Deutschland
XStella camera control version 2.1.3.271	Raytest, Straubenhardt, Deutschland
Graphit Pad Prism version 5.0	GraphPad Software, San Diego, USA
Tissue Studio v.3.6	Definiens AG, München, Deutschland

2.2 Lösungen, Puffer und Gele

Tabelle 12: Zusammensetzung hergestellter Lösungen

	Tris-HCl (1,5 M; pH 8,8)	Tris-HCl (0,5 M; pH 6,8)	APS (10%)	SDS (20%)
Tris-Base	90,75 g	30 g	-	-
HCl	pH 8,8 mit HCl (ca. 9 ml) einstellen	pH 6,8 mit HCl (ca. 19 ml) einstellen	-	-
VE-Wasser	Ad 500 ml	Ad 500 ml	Ad 10 ml	Ad 500 ml
Ammoniumpersulfat	-	-	1 g	-
SDS	-	-	-	100 g

Tabelle 13: Zusammensetzung hergestellter Puffer I

	TBS (10x)	TBST (1x)
NaCl	400 g	-
KCl	10 g	-
Tris-Base	150 g	-
HCl	pH 7,4 mit HCl (ca. 100 ml) einstellen	-
VE-Wasser	Ad 5000 ml	4500 ml
TBS (10x)	-	500 ml
Tween20 (50%)	-	10 ml

Tabelle 14: Zusammensetzung hergestellter Puffer II

0,1 M NaPi-Puffer	Hypotoner Puffer
<p>Lösung 1: 13,8 g Natriumdihydrogenphosphat (Monohydrat) ad 1 L destilliertes Wasser</p> <p>Lösung 2: 17,8 g Natriumdihydrogenphosphat (Dihydrat) ad 1 Liter destilliertes Wasser</p> <p>Von Lösung 2 100 ml vorlegen und mit Lösung 1 auf pH 7.3 einstellen.</p>	<p>0,5 mM NaPi-Puffer durch Verdünnung aus 0,1 M NaPi-Puffer herstellen und Proteaseinhibitor (Pefabloc) 1:1000 zugeben.</p>

Tabelle 15: Zusammensetzung hergestellter Puffer III

	Elektrophoresepuffer (Tankpuffer) (10 x)	Lade-Puffer (5x)	Transferpuffer
Tris	300 g	0,78 ml	29,0 g
Glycin	1440 g	2,50 ml	14,6 g
SDS	100g	2,50 ml	9,25 ml
Life-Science Wasser	-	2,97 ml	-
VE-Wasser	Ad 10 l	-	Ad 5000 ml
B-Mercaptoetanol	-	1,25 ml	-
Bromphenolblau	-	0,02 g	-
Methanol	-	-	1 l
	Für 1 x Gebrauchspuffer 1:10 verdünnen		

Tabelle 16: Zusammensetzung verwendeter Gele für die SDS-PAGE

Menganangabe für 2 Gele.

	Sammelgel	Trenngel (10%)
Life-Science Wasser	4,270 ml	4,050 ml
Tris-HCl (1,5 M; pH 8,8)	-	2,500 ml
Tris-HCl (0,5 M; pH 6,8)	1,750 ml	-
SDS (10%)	0,070 ml	0,100 ml
Acrylamid/Bis (30%)	0,930 ml	3,300 ml
APS (10%)	0,035 ml	0,050 ml
TEMED	0,007 ml	0,005 ml

Das im Labor verwendete Wasser wurde mittels der Aufbereitungsanlage MilliQ Integral 10 von Millipore in VE-Wasser (Reinstwasser) und Life-Science-Wasser (hochreines Wasser) aufbereitet.

Alle Arbeiten im Labor wurden unter Hilfestellung von Frau U. Waldherr und Frau Dr. rer. nat. P. Fisel aus dem Institut für Klinische Pharmakologie (IKP) in Stuttgart durchgeführt.

2.3 Zellkulturmethoden

2.3.1 Allgemeine Zellkulturarbeit

Sämtliche Arbeitsgänge der Zellkulturarbeit wurden an einer sterilen Werkbank (Laminar-flow Sicherheitswerkbank) unter sterilen Arbeitsbedingungen durchgeführt.

Verwendet wurden die Zelllinien A-498, 786-O, Caki-1 und Caki-2. Bei allen Zelllinien handelt es sich um epitheliale klarzellige humane Nierenzelladenokarzinome, die in Monolayern als Adhäsivkulturen wachsen und in der Tabelle 3 näher beschrieben sind. Die Zellen der Zelllinien A-498 und 786-O wuchsen in EMEM oder DMEM F-12, jeweils ergänzt mit 2 mM L-Glutamin und 10%igem FBS. Caki-1- und Caki-2-Zellen wuchsen in McCoy's 5A mit 10%igem FBS und 50 µg/ml Gentamicin.

2.3.2 Auftauen und Einfrieren der Zellen

Die bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagerten Tumorzelllinien wurden im Wasserbad aufgetaut. Der als Gefrierschutz enthaltene DMSO-Zusatz wurde durch Waschen mit dem jeweiligen zur Zelllinie passenden Medium entfernt. Die anschließende Zentrifugation (1400 xg, 5 min, RT) führte zur Trennung des DMSO von den Zellen. Nach Abpipetieren des Überstandes wurden die Zellen in ihrem jeweiligen Medium aufgenommen und in 25 cm² Zellkulturflaschen überführt. Die jeweilig hergestellten und verwendeten Standardwachstumsmedien sind in Tabelle 3 angegeben und wurden bei 4 °C aufbewahrt. Die Lagerung der Zellkulturen erfolgte bei 37 °C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ im Brutschrank.

Im Anschluss an die Experimente wurden die Zellen wieder eingefroren. Dazu wurden sie mittels StemPro Accutase trypsiniert und dann zentrifugiert. Um der Bildung von Eiskristallen in den Zellen und der damit verbundenen toxischen Zellschädigung während des Einfrierens entgegenzuwirken, wurden die Zellen in 10 % DMSO in FBS resuspendiert, in Kryotubes überführt und im Anschluss durch Verwendung des Nalgene Cryo1° Freezing Container langsam über 24 h auf -80 °C heruntergekühlt, um so einen zellschonenden

Einfrierprozess zu gewährleisten. Für eine längere Lagerung der Zellen (≥ 6 Monate) wurden diese nach 24 h in flüssigen Stickstoff eingelagert.

2.3.3 Passagieren der Zellen

Der Mediumwechsel erfolgte zweimal wöchentlich. Zur Zellexpansion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mittels StemPro Accutase trypsinisiert. Durch anschließende Inkubation für ca. 2 - 5 min im Brutschrank bis zur Ausfällung der Zellen wurden die Zellen proteolytisch aus dem Monolayer abgelöst. Eine leichtere Ablösung der noch am Boden haftenden Zellen wurde durch vorsichtiges seitliches Beklopfen des Zellkulturgefäßes erreicht. Um den Verdauungsvorgang durch die in der StemPro Accutase enthaltenen Enzyme zu stoppen, wurde das jeweilige passende Vollmedium hinzugegeben. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert (1400 xg, 5 min, RT) und der zellfreie Überstand abgesaugt. Die im Pellet enthaltenen Zellen wurden anschließend wieder im Medium resuspendiert und im vom Hersteller empfohlenen Splittungsverhältnis in neue Kulturflaschen ausgesät. Alle Zelllinien wurden in einer feuchtwarmen Atmosphäre von 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank gehalten.

2.3.4 Bestimmung der Zellzahl mittels Hämocytometers (Neubauer-Zählkammer)

Zur Vorbereitung der Zellen auf die Transfektion wurden die Zellen mit StemPro Accutase trypsinisiert, anschließend im Medium aufgenommen, zentrifugiert und das Pellet wieder in 1 ml des entsprechenden Mediums aufgenommen. Hiervon wurden 50 μ l mit 50 μ l Trypanblau gemischt und in die Neubauer-Zählkammer gegeben, bis diese voll war. Durch den Farbstoff Trypanblau wurde zuerst eine Vitalitätsprüfung in der Zählkammer durchgeführt. Vitale Zellen zeigen keine Aufnahme des Farbstoffs. Abgestorbene Zellen nehmen das Trypanblau aufgrund einer veränderten Membrandurchlässigkeit auf. Die Neubauer-Zählkammer besteht aus 9 großen Quadraten mit jeweils einer Fläche von 1 mm². Da die Höhe zwischen Objektträger und Deckglas 0,1 mm beträgt, befindet sich ein Volumen von 0,1 mm³ (entspricht 0,1 μ l; berechnet aus

1 mm x 1 mm x 0,1 mm) über jedem dieser Quadrate. Aufgrund der zu hohen Zellzahl in den auszählenden Quadraten wurde eine Verdünnung auf 10 ml mit dem jeweiligen Medium vorgenommen und wiederum davon 50 µl abgenommen und 50 µl Trypanblau zugegeben. Anschließend erfolgte erneut die Füllung der Neubauer-Zählkammer und Auszählung der Zellen in 4 Quadraten mittels Lichtmikroskop. Die Berechnung der vitalen Zellen in der Neubauer-Zählkammer erfolgte mit Hilfe der in Tabelle 17 aufgeführten Formel.

Tabelle 17: Bestimmung der vitalen Zellen in der Neubauer-Zählkammer

$N \times 2 \times 10^4 / \text{ml} = \text{Zellzahl} / \text{ml}$
N: Mittelwert aus der Zellzahl von 4 ausgezählten Quadraten der Neubauer-Zählkammer
x2: Verdünnung durch Trypanblau
$10^4 / \text{ml}$: Kammerfaktor (um die Zellzahl in 1 ml Zellsuspension zu erhalten)

Darauf folgend wurde das jeweils notwendige Zellsuspensionsvolumen, welches der im Protokoll für die Transfektion empfohlenen Anzahl von 375 000 Zellen entsprach, in neue 25 cm² Zellkulturflaschen mit dem jeweiligen Medium, hier nun aber auch für Caki-1 und Caki-2 ohne Antibiotika, gegeben.

2.4 Transfektion von siRNA

Zur Validierung des in den immunhistochemischen Färbungen verwendeten Antikörpers gegen CD147 wurde CD147 durch direktes Einbringen von siRNA-Oligonukleotiden mittels Transfektion und darüber vermitteltes Knockdown in den Zelllinien A-498, 786-O, Caki-1 und Caki-2 ausgeschaltet.

Beim Verfahren der RNA-Interferenz handelt es sich um eine Methode des posttranskriptionellen-Gen-Silencing, vermittelt durch RNA. Hinter dem Namen siRNA verbergen sich kleine RNA-Moleküle, die zwischen 21 und 23 Nukleotiden lang sind und durch Komplexbildung mit der Ziel-mRNA den Abbau dieser mRNA durch komplementäre Basenpaarung vermitteln. Auf diese Weise wird das Gen-Silencing durch Blockierung der Translation der Ziel-mRNA herbeigeführt [208]. Der CD147-Knockdown wurde mit Hilfe von CD147-targeting siRNAs (siGENOME SMARTpool - human BSG, Thermo Scientific, Lafayette, USA) durchgeführt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und Zellen, die mit non-targeting siRNAs (siGENOME non-targeting siRNA pool #1, Thermo Scientific, Lafayette, USA) transfiziert wurden.

Zur Transfektion wurde das Transfektionsreagenz DharmaFECT®1 der Firma Thermo Scientific mit dem dazugehörigen Protokoll verwendet, um auf diese Weise das fremde Genmaterial, hier in Form von siRNA, in die Tumorzellen zu überführen. Alle vier Zelllinien wurden hierfür mit der CD147-targeting siRNA strikt nach dem Protokoll des Herstellers transfiziert.

Direkt nach Erhalt wurden die siRNA und die Negativkontrolle (non-targeting) im mitgelieferten RNase-freien Wasser resuspendiert. Um mehrmaliges Einfrieren und Auftauen zu vermeiden, wurden die siRNA und die Negativkontrolle in 50 µM (entspricht 10 µl) aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

Für jede der vier Zelllinien bestand das Experiment aus drei Ansätzen. Diese beinhalteten die Positivkontrolle mit den mit siRNA (Basigin) behandelten Zellen, die Negativkontrolle mit den mit siRNA (non-targeting) behandelten Zellen und die Zellkulturkontrolle mit den unbehandelten Tumorzellen. Hierbei gab es pro Zelllinie und Ansatz jeweils drei Zellkulturflaschen. Davon waren

zwei Kulturflaschen für die später folgende Proteinanalyse durch Western-Blots vorgesehen und eine Kulturflasche für die spätere RNA-Analyse.

Nach 24 h Inkubation der in der Neubauer-Kammer abgezählten Zellen im jeweiligen Antibiotika-freien Medium startete die Transfektion. Die siRNA-Aliquots und non-targeting-Aliquots (Negativkontrolle) wurden auf Eis aufgetaut und ein Volumen von 50 μ M im Verhältnis 1:10 in RNase-freiem Wasser vorverdünnt. Von dieser Vorverdünnung wurden jeweils pro Ansatz dreimal 25 μ l siRNA bzw. siRNA (non-targeting) in separate Eppendorfgefäße überführt, mit 475 μ l serumfreiem Medium (OptiMEM+ GlutaMAX) verdünnt und für 5 min bei RT inkubiert. In separaten Eppendorfgefäßen wurde pro Ansatz (also sechsmal) 10 μ l Transfektionsreagenz (DharmaFect®1) in 490 μ l OptiMEM+ GlutaMAX aufgenommen und für 5 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze mit der verdünnten siRNA bzw. Negativkontrolle (non-targeting) und dem verdünnten Transfektionsreagenz aus den jeweils zusammengehörigen Eppendorfgefäßen durch mehrfaches vorsichtiges Auf- und Abpipettieren miteinander vermischt und dann für 20 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium in den Zellkulturflaschen abgesaugt und durch 4 ml frisches Antibiotika-freies Medium ersetzt. In dieses Medium wurde pro Zellkulturflasche 1 ml des entstandenen Gemischs aus entweder siRNA oder Negativkontrolle (non-targeting) und Transfektionsreagenz gegeben, um so die finale siRNA- bzw. non-targeting Konzentration von 25 nM zu erhalten. Ein Mediumwechsel mit 5 ml frischem Medium wurde ebenfalls bei den Flaschen mit der Zellkulturkontrolle, die die unbehandelten nicht-transfizierten Tumorzellen enthielten, durchgeführt. Anschließend erfolgte die Inkubation aller Zellkulturflaschen für 72 h im Brutschrank.

Nach erfolgter Inkubation wurden die transfizierten Zellen geerntet. Hierfür wurden sie in den Kulturflaschen durch Einsatz eines Zellschabers vorsichtig vom Untergrund der Zellkulturgefäße, an den sie angewachsen waren, entfernt, mit dem noch enthaltenen Medium abgespült und in 15 ml Röhrchen zur anschließenden Zentrifugierung (1000 xg, 15 min, RT) überführt. Die jeweils zusammenpassenden gleichen Ansätze für die Proteinanalyse wurden gepoolt.

Ab hier unterschied sich die weitere Behandlung der Zellen, je nachdem, ob daraus die RNA oder die Proteine gewonnen werden sollten.

2.5 Isolierung und Quantifizierung von RNA aus Zellkulturen

2.5.1 mRNA-Isolierung mittels Kit

Für die RNA-Analyse wurde pro Zelllinie jeweils einer der unter Punkt 2.3 entstandenen Ansätze mit siRNA, non-targeting und Zellkulturkontrolle verwendet. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde zentrifugiert (1400 xg, 5 min, RT), der Überstand wiederum abgenommen und das Zellpellet bis zur RNA-Isolierung bei -8 °C eingefroren.

Für die Isolierung der RNA wurde das mirVana™ miRNA Isolation Kit verwendet. Die darin mitgelieferten und verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 18 zusammengestellt. Als erster Schritt wurden je 600 µl Lyseindepuffer in separate Gefäße (Lysing Matrix D, 2 ml) gegeben. Hier hinein wurden die bei -80 °C eingefrorenen Pellets gegeben. Im Kühlraum wurden die Gewebe in den Gefäßen dann im FastPrep-24-Homogenizer in Zyklen für jeweils 20 sec bei 6 m/s aufgebrochen und erfolgreich lysiert. Zwischen den Zyklen wurden die Proben für jeweils 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde jeweils 1/10 Volumen (entspricht 60 µl) des miRNA Homogenate Additive hinzugegeben, die Gefäße auf dem Vortexer gemischt und anschließend für 10 min zur Inkubation auf Eis gestellt. Zur Separierung der RNA von anderen Zellbestandteilen erfolgte die Zugabe von 600 µl Phenolchloroform mit anschließendem Vortexen für 30 - 60 sec. Diese Ansätze wurden daraufhin zentrifugiert (13.000 xg, 5 min, RT). Die durch das Zentrifugieren beschleunigte Phasentrennung zeigte drei Phasen: unten eine Phenolchloroform-Phase, eine Interphase und eine obere farblose, wässrige Phase. Die obere Phase wurde vorsichtig mittels Pipette abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zum Präzipitieren der RNA wurden dort 1,25 Volumen Ethanol hinzugegeben und zum Mischen auf- und abpipettiert.

Der Inhalt wurde mit einer Pipette in ein neues Eppendorfgefäß mit einliegendem Filter gegeben und auf diese Weise zentrifugiert (10.000 xg, 30 sec, RT), um das Gemisch durch den Filter durchzuschleusen. Der Filter wurde entnommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Waschlösung I, die durch Zugabe von 21 ml Ethanol zur im Kit enthaltenen miRNA Wash Solution I hergestellt wurde, auf den Filter gegeben und wieder zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde auf die gleiche Weise noch zwei Mal durchgeführt, allerdings unter Verwendung der Waschlösungen 2/3, die durch Zugabe von 40 ml Ethanol zur im Kit enthaltenen Wash Solution 2/3 hergestellt wurde. Am Ende wurde der Filter wieder in ein neues Eppendorfgefäß überführt und nochmals "trocken" für 1 min zentrifugiert. Der Filter wurde ein letztes Mal in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 100 µl 95 °C heißes nukleasefreies Wasser auf die Mitte des Filters gegeben und anschließend für 30 sec zentrifugiert. Der Filter konnte entsorgt werden und im Eppendorfgefäß verblieben war die RNA, die bei -80 °C gelagert wurde.

Tabelle 18: Inhalt des mirVana™ miRNA Isolation Kits

Material	Lagerung
miRNA Wash Solution I	RT
Wash Solution 2/3	RT
Sammelgefäße	RT
Filterpatronen	RT
Lysebindepuffer	4°C
miRNA Homogenate Additive	4°C
Ladenpuffer II	-20°C
Elutionslösung	-20°C, 4°C, oder RT

2.5.2 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration und Bestimmung der Qualität mittels Agilent Bioanalyzer

Die Konzentration und Reinheit der RNA aus den Proben wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers (NanoDrop 2000/2000c) durch Messung der Extinktion bei 260 nm (A_{260}) bestimmt. Des Weiteren wurde die Qualität und Quantität der RNA unter Verwendung des Agilent RNA 6000 Nano Kits und dem Agilent Bioanalyzer bewertet. Der Inhalt des Agilent RNA 6000 Nano Kits ist in Tabelle 19 aufgelistet.

Zur Vorbereitung wurden separat je 1,5 μ l der RNA-Proben und je 1,5 μ l des RNA 6000 Ladders in RNase-freie Eppendorfgefäße pipettiert. Es folgte eine Denaturierung für 2 min bei 70 °C. Danach wurden die Proben auf Eis gestellt. Zur Vorbereitung des Gels wurden 550 μ l der Agilent RNA 6000 Nano gel matrix auf die mitgelieferte Säule aufgebracht und diese anschließend für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Hiervon wurden 65 μ l in 0,5 ml RNase-freie Eppendorfgefäße aliquotiert. Als weiterer Schritt wurde das RNA 6000 Nano Dye 10 sec im Vortexer geschüttelt und je 1 μ l in ein 65 μ l Gel-Aliquot pipettiert. Dieses Gemisch aus Gel und Dye wurde wieder im Vortexer gründlich gemischt und für 10 min bei 1400 rpm zentrifugiert.

Im weiteren Verlauf wurde der Agilent Bioanalyzer gestartet und das Assay "Eukaryote Total RNA Nano series" gewählt. Ein neuer Chip wurde aus dem Kit entnommen und in der Chip-Priming-Station platziert. In die mit "G"- markierte Senke wurden 0,9 μ l des vorher hergestellten Gemisches aus Gel und Dye auf den Boden luftblasenfrei pipettiert und anschließend mittels Deckel verschlossen. Sodann wurde der Hebel der Chip-Priming-Station heruntergedrückt, für 30 sec abgewartet, anschließend losgelassen, für 5 sec abgewartet und danach auf 1 ml hochgezogen. Die Chip-Priming-Station wurde geöffnet und je 0,9 μ l des Gemisches aus Gel und Dye in die mit "G"- gekennzeichneten Senken pipettiert. Im Anschluss wurden je 5 μ l des RNA 6000 Markers in das mit #-markierte Feld und die weiteren 12 Felder gegeben. Darauf folgte das Auftragen des Ladders und der Proben. Hierzu wurde 1 μ l des RNA-Ladders in das mit #-markierte Feld aufgetragen und zudem je 1 μ l der Proben in jedes der 12 Felder gegeben. Der Chip wurde für 1 min im Vortexer

gemischt, innerhalb von 5 min in den Agilent 2100 Bioanalyser eingesetzt und die Messung mittels Software begonnen.

Tabelle 19: Inhalt des Agilent RNA 6000 Nano Kits

Inhalt des Agilent RNA 6000 Nano Kit

Agilent RNA 6000 Nano Reagenzien

Agilent RNA 6000 Ladder (gelber Deckel)

RNA Nano Dye Concentrate (blauer Deckel)

Agilent RNA 6000 Nano Marker (2 Fläschchen) (grüner Deckel)

Agilent RNA 6000 Nano Gel Matrix (2 Fläschchen) (roter Deckel)

Agilent RNA 6000 Nano Chips

25 RNA Nano Chips

2 Elektrodenreiniger

Gefäße für das Gel-Dye-Gemisch

30 verschließbare Eppendorfgefäße PCR-rein (DNase/RNase frei)

1 Spritze

4 Spin-Filter

2.6 Proteinanalyse mittels Western-Blot

2.6.1 Proteinisolierung

Für die Proteinanalyse mittels Western-Blot wurden pro Zelllinie von den unter Punkt 2.3 entstandenen und gepoolten Ansätzen mit jeweils siRNA, non-targeting und Zellkulturkontrolle der Überstand abgenommen und das Pellet in 500 µl hypotonem Puffer mit 0,5 µl PIC (Protease Inhibitor, 1:1000) und 0,5 µl Pefablock SC (1:1000) resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellsuspensionen für 10 sec zum Aufbrechen der Zellen und zur Homogenisierung mittels Ultraschall (Ultrasonic Homogenizer Sonoplus HD200, Bandelin) auf Eis behandelt und danach für 1 h bei 4 °C zentrifugiert (14000 rpm). Der Überstand mit den enthaltenen zytoplasmatischen Proteinen wurde abgenommen und bei -20 °C eingefroren. Das Pellet, das die rohen Membrananteile enthielt, wurde in 50 µl hypotonem Puffer resuspendiert und anschließend auch bei -20 °C eingefroren.

2.6.2 Proteinbestimmung nach Smith in Mikrotiterplatte

Da für die spätere Western-Blot-Analyse die gleiche Proteinmenge pro Bande aufgetragen werden sollte, wurde die Proteinkonzentration in den Proben mit der Methode nach Smith in einer Mikrotiterplatte bestimmt. Diese Methode wird zur quantitativen Bestimmung von Proteinen verwendet und basiert auf dem Nachweisprotein Bicinchoninsäure (BCA). Hintergrund ist, dass im Versuch zugegebenes Kupfer-II-Sulfat mit den in den Proben enthaltenen Proteinen quantitativ je nach Menge an enthaltenem Protein zu einwertigen Kupferionen reagiert, die sogenannte "Biuret Reaktion" [209, 210]. Bicinchoninsäure bildet im alkalischen Milieu mit diesen einwertigen Kupferionen einen stabilen violetten Komplex, dessen Farbintensität je nach enthaltener Proteinkonzentration variiert [209]. Die Absorption des violetten Farbkomplexes kann bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch quantifiziert werden.

Für die benötigte Eichgerade wurde eine BSA-Stocklösung durch Lösung von 20 mg BSA in 20 ml H₂O hergestellt. Die Proben der Eichkurve wurden auf

Proteinkonzentrationen zwischen 0 und 1000 µg/ml eingestellt und entsprechend Tabelle 20 pipettiert. Als Leerwert diente ein Ansatz, welcher nur Wasser enthielt. Von diesen Proben für die Eichpunkte wurden 10 µl in einer 96-well Mikrotiterplatte doppelt nebeneinander aufgetragen.

Tabelle 20: Pipettierschema der Eichpunkte

BSA (µg/ml)	µl aus BSA-Stocklösung (1mg/ml)	µl H ₂ O (Life Science)
0	-	100
200	20	80
400	40	60
600	60	40
800	80	20
1000	100	0

Es wurden die unter Punkt 2.6.1 entstandenen Proben verwendet und hiervon pro Zelllinie jeweils das Pellet und der Überstand. Alle Proben wurden im Verhältnis 1:20 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt und jeweils 10 µl davon doppelt nebeneinander auf eine 96-well Mikrotiterplatte aufgetragen. Von den Eichpunkten und Proben wurden somit immer Zweifachbestimmungen durchgeführt.

Nach Zugabe von 200 µl Smith-Reagenz (4 % Kupfer-II-Sulfat + Bicinchoninsäure 1:50) wurden die Proben (Eichproben und zu untersuchende Proben) kurz auf einem Rüttelinkubator (Plate Shaker Titramax 100) gemischt und anschließend für 1 h bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert. Nach erneutem Schütteln erfolgte die Auswertung durch Messung der Extinktion bei 570 nm gegen den Leerwert im Elisa-Reader Wallac (Methode: Smith Proteinbestimmung, Filter 570 nm). Im Anschluss ließ sich aus den in einer Excel-Tabelle gespeicherten Messdaten der Proteingehalt der Proben über die Kalibriergerade aus den Proben mit bovinem Serumalbumin berechnen.

2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Vor dem eigentlichen Western-Blot-Verfahren wurden die Proteingemische aufgetrennt. Als Elektrophorese-Methode wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli angewendet. Hierbei handelt es sich um ein System mit zwei Gelen, einem Trenngel (unten) und einem Sammelgel (oben), die sich beide im Hinblick auf den pH-Wert, die Ionenstärke und die Porengröße unterscheiden. Im Sammelgel erfolgte die Konzentration der Proben, bevor sie im Trenngel aufgetrennt wurden [211]. Das SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat) belädt alle Proteine mit einer negativen Ladung, sodass die intrinsische Ladung der Proteine maskiert wird und sich die Proteine nach ihrer Größe (Molekulargewicht) mittels PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) in Proteinbanden auftrennen. Als Molekulargewichtsmarker wurde der Prestained Molecular Weight Marker von Sigma-Aldrich verwendet.

Die Herstellung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele ist in der Tabelle 16 näher beschrieben. Das Trenngel wurde zuerst in den Zwischenraum von zwei in einem Gießstand (enthalten im Mini-PROTEAN® Tetra system von Biorad) eingespannten Glasplatten, die vorher mit 70 % Isopropanol gereinigt wurden, gegossen und sofort mit 70 % Isopropanol überschichtet. Nach ca. 30 min Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen, mit VE-Wasser abgespült und mit Filterpapier getrocknet, ohne dabei das Trenngel zu berühren. Das Trenngel wurde dann mit dem Sammelgel randvoll überschichtet und der Kamm möglichst blasenfrei zwischen die Scheiben eingeführt. Nach wiederum ca. 30 min Polymerisation konnten die Glasscheiben mit Gel und Kämmen aus der Gießkammer entfernt und in feuchten Tüchern verpackt bei 4 - 8 °C bis zu 7 Tage aufbewahrt werden.

Die Gelkonzentration und die damit eingesetzte Menge an Acrylamid/Bis-Lösung ist abhängig vom Molekulargewicht der zu trennenden Proteine. Da CD147 ein Molekulargewicht zwischen 35 - 65 kDa besitzt und das Molekulargewicht von MCT4 54 kDa beträgt, wurde ein 10%iges Trenngel, das für den Größenbereich von 30 - 120 kDa ideal ist, verwendet.

Gemäß den Anweisungen des Herstellers wurden die komplett polymerisierten Gele in die vertikalen Minigel-Elektrophoresekammern (Mini-PROTEAN® Tetra system, Biorad) eingesetzt und die Kammern mit Elektrophorese-Puffer befüllt. Die gewünschte Proteinkonzentration pro Tasche wurde auf 10 µg festgelegt. Die dieser Konzentration entsprechende Menge an µl Probenflüssigkeit aus den Proben der vier Zellreihen mit jeweiligem Pellet und Überstand wurde mit 5 µl Lade-Puffer (5x) versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 20 µl mit hypotonem Puffer aufgefüllt und dann 30 min bei 37 °C im Cycler denaturiert. Anschließend wurden die Proben luftblasenfrei in die Geltaschen, die nach dem Herausziehen des Kamms entstanden waren, gefüllt.

Der Prestained Molecular Weight Marker, der nachher zur Bestimmung der Größe der aufgetrennten Proteine herangezogen wurde, wurde 1 min bei 95 °C im Heizblock (Thermomixer Compact, Eppendorf) erhitzt und dann zügig in die erste und letzte Tasche der vorbereiteten Gele aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 15 min bei 150 V im Sammelgel und anschließend bei 110 V im Trenngel über ca. 1,5 h und wurde beendet, sobald die Lauffront am Gelende angekommen war. Der Nachweis der mittels Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine erfolgte durch eine Western-Blot-Analyse.

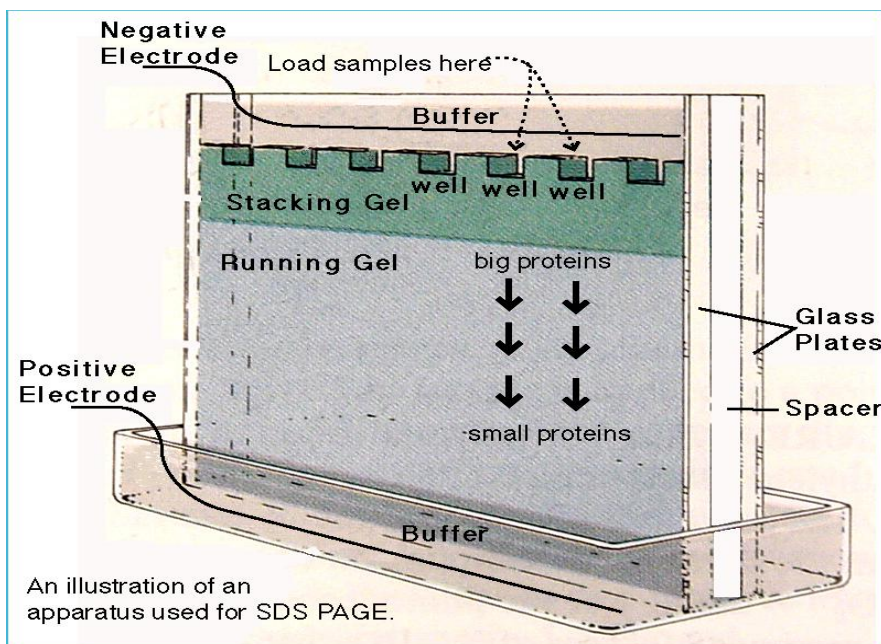


Abbildung 2: Apparat für die SDS-PAGE

Die Abbildung wurde aus dem Internet bezogen [212].

2.6.4 Western-Blot-Analyse

Der CD147-Knockdown wurde in einer Western-Blot-Analyse bewertet.

Beim Western-Blot-Verfahren werden gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Trägermembran übertragen (Blotting) und anschließend durch molekularbiologische Verfahren, hier durch Antikörper-Reaktionen, nachgewiesen [213, 214].

Die nun im Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels Semidry-Verfahrens in einer Transferkassette auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Blotting). Die hierfür verwendeten Materialien wurden davor in Transferpuffer getränkt. Die Kassette wurde in folgender Reihenfolge möglichst luftblasenfrei und unter ständiger Feuchthaltung zusammengesetzt: Glasfaservlies, Whatman-Filterpapier, Nitrozellulosemembran, Gel, zweites Whatman-Filterpapier, zweites Glasfaservlies. Die Kassette wurde dann in eine Transferkammer (Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell, Biorad) bei 150 V über circa 1 h in 4 °C kaltem Transferpuffer (mit Eisakku und Rührfisch) gestellt, wobei die Membran auf der Anodenseite zu liegen kommen muss. Auf diese Weise wurden die Proteine auf die Nitrozellulosemembran geblottet.

Nach Beendigung wurde die Nitrozellulosemembran zur Entfernung der im Transferpuffer enthaltenen Methanolreste kurz in TBS geschwenkt. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Übertragung der Proteine auf die Membran wurde die Membran anschließend für ca. 2 min in Ponceau angefärbt und das Ergebnis fotokopiert. Durch ein kurzes Waschen in TBST erfolgte die Entfärbung.

Die auf die Membran übertragenen Proteine konnten in der Folge durch spezifische Antikörper in einer Antigen-Antikörperreaktion nachgewiesen werden. Alle folgenden Inkubationszeiten wurden auf einem Rüttler durchgeführt. Zuerst wurden die Nitrozellulosemembranen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h in 5 % Magermilchpulver (gelöst in TBST) gelegt. Es folgte ein kurzes Waschen in TBST und die Inkubation der Membranen mit dem Erstantikörper über Nacht bei 4 °C, eingeschweißt in einer Folie. Hier wurden je nach Versuchsaufbau entweder der primäre Antikörper gegen CD147 (ab78106, Abcam, Cambridge, United Kingdom, Verdünnung

1:5000 in TBST) oder gegen MCT4 (H-90, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA, Verdünnung 1:200 in TBST) gewählt. Nach dreimaligem Waschen der Nitrozellulosemembranen mit TBST für jeweils 10 min zur Entfernung der nicht gebundenen Antikörper folgte die 60minütige Inkubation mit dem entsprechenden Meerrettichperoxidase-gekoppelten Zweitantikörper (HRP-gekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper, Verdünnung 1:5000 in TBST) bei RT. Die Membranen wurden wieder dreimalig 5 min in TBST und einmalig 5 min in TBS gewaschen.

Der Nachweis der immunreaktiven Proteine auf den Nitrozellulosemembranen wurde durch Chemolumineszenz geführt. Die Nitrozellulosemembranen wurden für 1 min mit der Chemolumineszenzlösung SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate, die Luminol und Wasserstoffperoxid enthält, behandelt. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase ist ein ausgezeichneter Katalysator für die Chemolumineszenz von Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid. Die bei der Chemolumineszenz entstandene Lichtmenge ist proportional zur Stoffmenge an Antikörper und damit auch proportional zur Stoffmenge an Antigen [215]. Die Chemolumineszenzreaktion konnte im Anschluss mit dem Stella 3200 Imaging System detektiert werden, wobei sich die Belichtungszeit nach der Stärke des Signals richtete. Sie lag hier bei 10 sec. Zur Quantifizierung der Grau-Schwarz-Intensität wurde das Programm AIDA (Advanced Image Dater Analyzer) der Firma Raytest herangezogen.

Als Kontrolle und zur Sicherstellung einer gleichmäßigen Proteinbeladung der Proben wurde β -Aktin mittels geeignetem Antikörper auf den Nitrozellulosemembranen nachgewiesen. Hierfür mussten zuerst die vorher gebundenen Antikörper entfernt werden (Stripping). Dies geschah durch 30minütige Inkubation der Membranen mit einer Stripping-Lösung (Restore™ Western Blot Stripping Buffer). Die Membranen wurden anschließend 3 x 10 min mit TBST gewaschen und dann mit dem gegen β -Aktin gerichteten Antikörper (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Verdünnung 1:5000 in TBST) 1 h bei RT inkubiert. Es folgte wieder ein Waschen 3 x 10 min mit TBST und dann die einstündige Inkubation mit dem entsprechenden Meerrettichperoxidase-

gekoppelten Zweitantikörper (HRP-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper, Verdünnung 1:5000 in TBST) bei RT. Die Visualisierung erfolgte ebenfalls durch das Stella 3200 Imaging System.

2.7 Patientenkollektiv und Datenerhebung

In die Studie eingeschlossen wurden zwei unabhängige retrospektive Patientenkohorten, die im Rahmen der Diagnose und Therapie eines klarzelliges Nierenzellkarzinoms in der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen im Zeitraum von 1993 bis 2010 operativ versorgt wurden. Voraussetzung zum Studieneinschluss war die histologische Sicherung des klarzelliges Nierenzellkarzinoms. Kohorte 1 beinhaltete 186 Patienten kaukasischer Herkunft mit einem klarzelliges Nierenzellkarzinom, die sich zwischen 1993 und 2007 einer partiellen oder radikalen Nephrektomie unterzogen. In Formalin-fixierte Paraffinblöcke des Tumors und des tumorumgebenden normalen Nierengewebes waren vorhanden. Ebenso wurde eine ausführliche Sammlung der klinisch-pathologischen Parameter für jeden Patienten erhoben. Die zweite unabhängige Kohorte (Kohorte 3) umfasste 59 Patienten, die im Zeitraum von 2007 bis 2010 operiert wurden. Zusätzlich zu den in Formalin-fixierten Paraffinblöcken war für diese Kohorte gefrorenes Frischgewebe des Tumors mit umgebendem Normalgewebe vorhanden.

Die Tumoren wurden nach der 7. Edition des Union Internationale Contre le Cancer/American joint committee on cancer system (2010) nach dem TNM-System pathologisch klassifiziert und dem nukleären Gradingssystem nach Fuhrman zugeteilt.

Für die Überlebensanalyse wurde bei allen Patienten ein Follow-up mittels einer telefonischen Erfragung des Gesundheitszustands durchgeführt. Hierbei wurde der Operationszeitpunkt des Tumors als Beginn der Follow-up-Periode festgelegt. Endpunkte waren ein tumorabhängiges Versterben oder ein Gesamtüberleben bis zur letzten Follow-up-Erhebung im November 2014. Insoweit wurden Patienten mit Follow-up-Zeiträumen von 0 - 19,2 Jahren dokumentiert. Die Informationen über das Vorhandensein eines Rezidivs, einer

Metastasierung und auch die Todesursache waren für alle Fälle vorhanden. Patienten, die tumorunabhängig verstarben oder deren Follow-up-Ergebnisse unvollständig oder nicht eindeutig waren, wurden aus dem Fallkollektiv ausgeschlossen. Keiner der Patienten aus Kohorte 1 und 3 erhielt eine neoadjuvante Therapie, weder eine Immun- noch eine Chemotherapie. Die detaillierten Patientencharakteristika, klinisch-pathologische Eigenschaften und Überlebensdaten sind in der Tabelle 21 aufgeführt.

Für die Verwendung des Gewebes zu Forschungszwecken lagen die schriftlichen Patienteneinwilligungen vor. Zudem wurde die Verwendung des Gewebes für diese Studie von der Ethikkommission der Universität Tübingen (Antragsnummer 150/2012BO2) bewilligt und wurde nach deren Richtlinien durchgeführt.

Zusätzlich wurde eine dritte unabhängige Kohorte (Kohorte 2), die ebenfalls Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom enthielt, von einer öffentlich verfügbaren Datenbank des The Cancer Genome Atlas (TCGA) zur Validierung der Daten herangezogen. Hier wurden die klinischen Daten und RNA-Sequenzierungsdaten (n=529 für das klarzellige Nierenzellkarzinom, n=72 für non-Tumor, n=510 mit Informationen über das tumorspezifische Überleben (CSS)) für die Analyse durch den Mathematiker S. Winter genutzt. Die verarbeiteten Datensätze wurden am 15. Mai 2015 vom TCGA Datenportal (<http://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>) unter Anwendung des Data Browsers Tools bezogen. Die Charakteristika der Kohorte 2 vom TCGA sind in der Tabelle 21 zusammengefasst.

2.7.1 Untersuchungsmaterial

Als Proben wurden die im Pathologischen Institut der Universitätsklinik Tübingen eingelagerten Paraffinblöcke mit den Nierenpräparaten der Kohorte 1 und 3 verwendet. Die aus den Operationen gewonnenen Präparate wurden im Voraus durch Medizinisch-technische Assistenten des Pathologischen Instituts der Universitätsklinik Tübingen in 4,5 % Phosphat-gepuffertem Formalin fixiert.

Es folgte die Dehydrierung über eine aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol 70 %: zweimal 30 min, Ethanol 96 %: zweimal 30 min, Ethanol 100 %: zweimal 30 min und einmal 60 min) und anschließend die Einbettung in Paraffin (Xylol einmal 60 min, Xylol einmal 120 min, dann bei 60 °C Paraffin einmal 60 min, danach 120 min) mit Hilfe eines Einbettautomaten an einer Gießstation. Die paraffinierten Gewebeproben wurden im Anschluss im Pathologischen Institut der Universitätsklinik Tübingen eingelagert.

2.7.2 Tissue Microarray Technik (TMA)

Die Grundlage der TMA-Technik, bei der mehrere unterschiedliche Gewebeproben auf einem Paraffinblock vereint werden, wurde im Jahre 1986 von *Battifora et al.* entwickelt [216]. Zur Untersuchung des Patientenkollektivs wurde hier die von *Kononen et al.* im Jahr 1997 durch die Entwicklung eines Apparates für die Produktion der TMAs vorangetriebene TMA-Technik gewählt [217]. Diese erlaubt auf eine hoch effiziente und wirtschaftliche Weise eine große Anzahl an Gewebeproben (bis zu 1.000) auf einem Objektträger durch einen Färbegang zeitsparend und gleichmäßig immunhistochemisch zu bearbeiten, da alle Proben den gleichen experimentellen Bedingungen zugeführt werden. So sind die Reagenzienkonzentration, die Inkubationszeiten mit primärem und sekundärem Antikörper, Temperatur und Waschbedingungen für jedes Core auf dem TMA gleich. Dies führt zu einem davor nicht dagewesenen Niveau an Standardisierung. Anschließend können alle Proben nebeneinander auf den TMA-Objektträgern ausgewertet werden. Dadurch kann die Variabilität von Objektträger zu Objektträger beseitigt werden [218-220]. Die Verwendung von Färbeautomaten trägt hierzu auch einen wichtigen Teil bei. Auf diese Weise lässt sich die Qualität der Daten, die aus immunhistochemischen Untersuchungen gewonnen werden, erheblich verbessern [219].

Mögliche Untersuchungen an den TMA-Blöcken sind die Untersuchung der Gewebemorphologie durch eine HE-Färbung, der Proteinexpression mittels Immunhistochemie, der mRNA-Expression durch mRNA in-situ-Hybridisierung

oder auch die Analyse von genetischen Veränderungen durch eine FISH-Untersuchung [218, 221]. Dadurch erleichtert sich die Schaffung von Zusammenhängen zwischen molekularen Entdeckungen auf DNA-, RNA- und Protein-Ebene und den klinischen Merkmalen [221].

Auch stellt die Gewebheterogenität keine Einschränkung für die Verwendung von TMAs dar. Im Gegenteil, es liegt laut Studien eine hohe Konkordanz zwischen den TMA-Cores und den Schnitten mit dem kompletten Gewebe bei verschiedenen Tumortypen vor [218]. So zeigten eine Studie am Gewebe des Mammakarzinoms, dass zwei 0,6 mm Cores eine 95%ige Korrelation in der Färbeintensität mit Färbungen des kompletten Gewebeschnittes hatten [222]. Eine weitere Studie konnte bestätigen, dass der berechnete Score von durchschnittlich zwei Histospots ausreicht, um den Score vom kompletten Gewebestück in mehr als 95 % darzustellen [223]. Heterogene Tumoren, wie das Hodgkin-Lymphom und Prostatakarzinom, sind ebenfalls Kandidaten für die TMA-Technik, vorausgesetzt, es fand eine sorgfältige Auswahl der repräsentativen Tumorregionen statt [218].

Für diese Untersuchung wurden die passend zu den vorhandenen Tumorblöcken mit HE-gefärbten Schnitte aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der Universitätsklinik Tübingen herausgesucht und histologisch am Mikroskop reevaluiert. Für jeden Patienten wurden zwei Tumor- und ein Normalgewebereich ausgewählt und mittels Filzstift auf dem Objektträger eingezeichnet. Es wurden hierfür pathologisch repräsentative Bereiche für den ganzen Tumor gewählt, die weder Nekrose, Fibrose, noch große Blutgefäße enthielten. Das benigne Nierengewebe war histologisch unauffällig und frei von Tumorinvasion. Diese Auswahl geschah unter Anleitung und ständigem Feedback des Pathologen Dr. med. M. Scharpf, der große Erfahrung im Bereich der Diagnose des Nierenzellkarzinoms hat. Die eingezeichneten Areale wurden mit dem entsprechenden Paraffinblock abgeglichen. Aus diesen Arealen im Paraffinblock wurden dann mittels eines Manuellen Tissue Microarrays Model MTA-1, der eine Hohlnadel enthält, Gewebezylinder entnommen. Dabei wurden pro Patient zwei Gewebezylinder aus verschiedenen Tumorarealen und ein Gewebezylinder aus dem benignen Nierengewebe, jeweils mit einem

Durchmesser von 0,6 mm und einer Tiefe von 2 mm, ausgestanzt. Die Gewebezylinder wurden in einen leeren Paraffinblock, der im Pathologischen Institut der Universitätsklinik Tübingen gegossen wurde, in davor passend ausgestanzte Hohlräume mit einer Tiefe von 2 mm platziert. Zur genauen Platzierung half hier eine X-Y-Koordinateneinstellung. Für jeden Patienten wurden nebeneinander die beiden Tumorareale und in dritter Position das Normalgewebe positioniert. Zur Orientierung auf dem TMA-Block wurden andere Gewebestanzungen, z.B. Leber- oder Plazentagewebe, in einer bestimmten Position auf dem Block aufgebracht. Die Zuordnung der Stanzzyylinder auf dem TMA-Block mit den Patientendaten wurde unter Anwendung des X-Y-Koordinatensystems und einer parallel dazu geführten Tabelle gewährleistet. Im Mittel wurden Proben von 24 Patienten auf einem Gewebeblock aufgebracht.

Die Fixierung erfolgte durch manuelles Aufdrücken der Blöcke auf einen Objektträger und anschließender Erwärmung in einem Trockenschrank (10 min bei 56 °C, danach 30 min bei 37 °C) mit nachfolgender Abkühlung bei RT. Durch anschließende Abkühlung auf 4 °C konnte der Objektträger leicht vom TMA-Block entfernt und der TMA-Block so bis zur Verwendung aufbewahrt werden. Bevor der Block geschnitten werden konnte, musste er über Nacht bei -20 °C gelagert werden. Durch Verwendung eines Mikrotoms wurden von den in Paraffin eingebetteten TMA-Blöcken 5 µm dünne Schnitte abgetragen und auf die Objektträger Super Frost® Plus aufgebracht. Vor der Färbung wurden die Schnitte über Nacht bei 37 °C im Trockenschrank aufbewahrt. Ein TMA-Block kann auf diese Weise für Analysen an der Kohorte in 100 - 200 Stücke geschnitten werden, je nach Gewebeblock und Dicke der Gewebeproben [218].

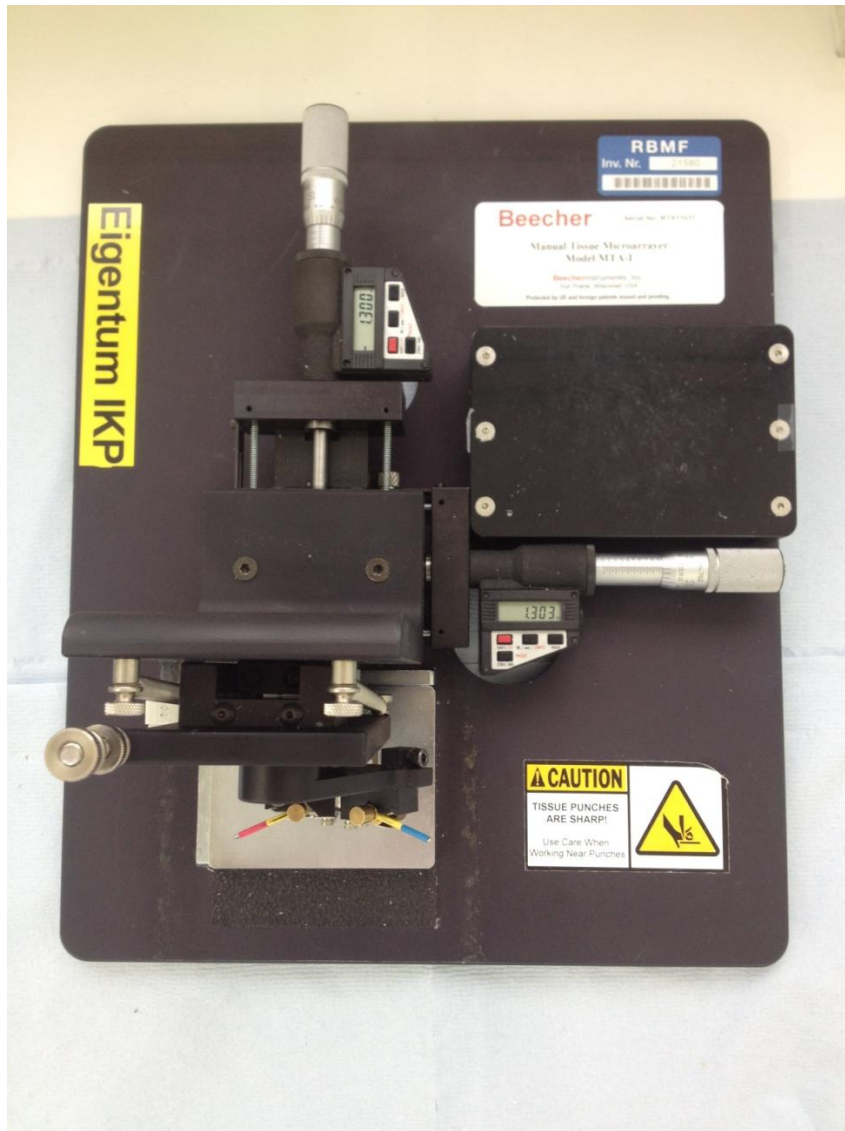


Abbildung 3: Manueller Tissue Microarrayer Model MTA-1

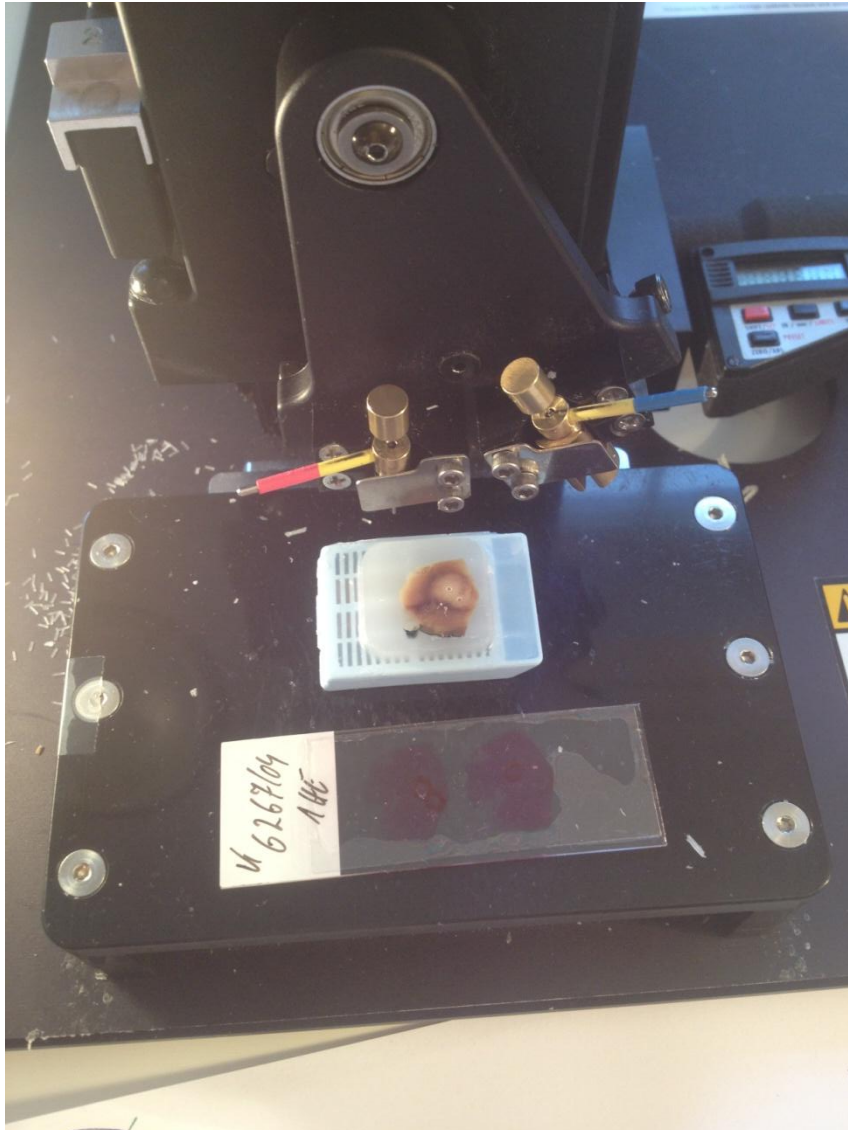


Abbildung 4: Tissue Microarray Model MTA-1 mit Paraffinblock und HE-Schnitt
*Entnahme von 2 Gewebezylindern aus verschiedenen Arealen aus dem in Paraffin-
eingebetteten Nierentumorgewebe mit Hilfe einer Hohlneedle. Im unteren Bildbereich
liegt der zum Paraffinblock gehörige Objektträger mit der HE-Färbung anhand dieser
vorher 2 für den Tumor repräsentative Areale ausgewählt und eingezeichnet wurden,
welche dann entsprechend im Gewebekblock durch Abgleich der Position
ausgewählt wurden.*

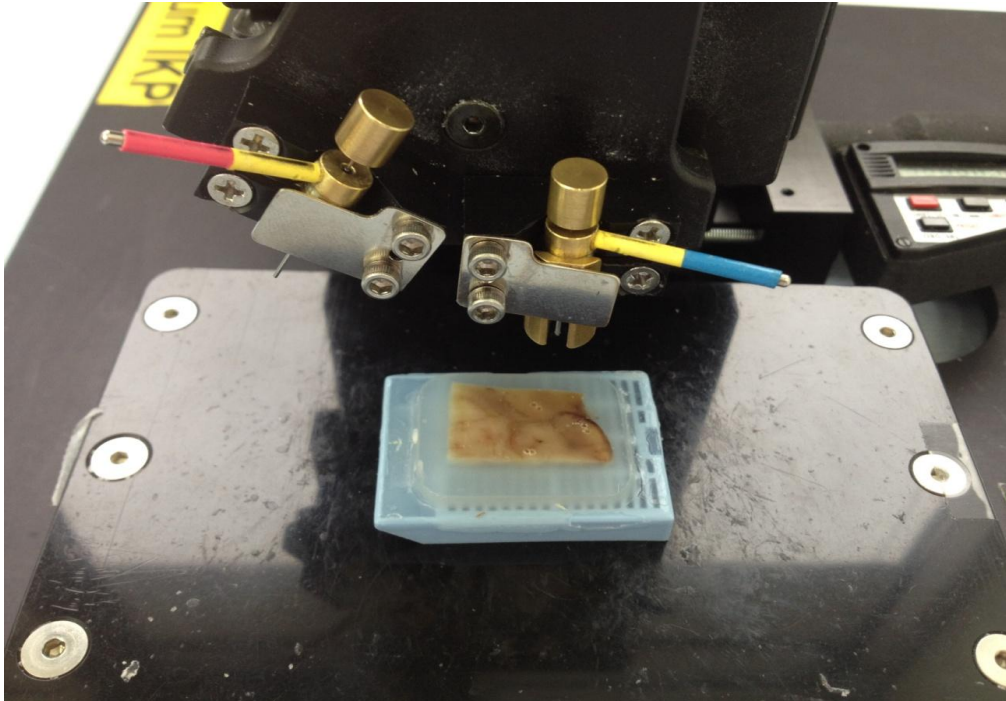


Abbildung 5: Nadelsystem des Manuellen Tissue Microarrays Model MTA-1 mit einem im Paraffinblock eingebetteten Nierentumorgewebe

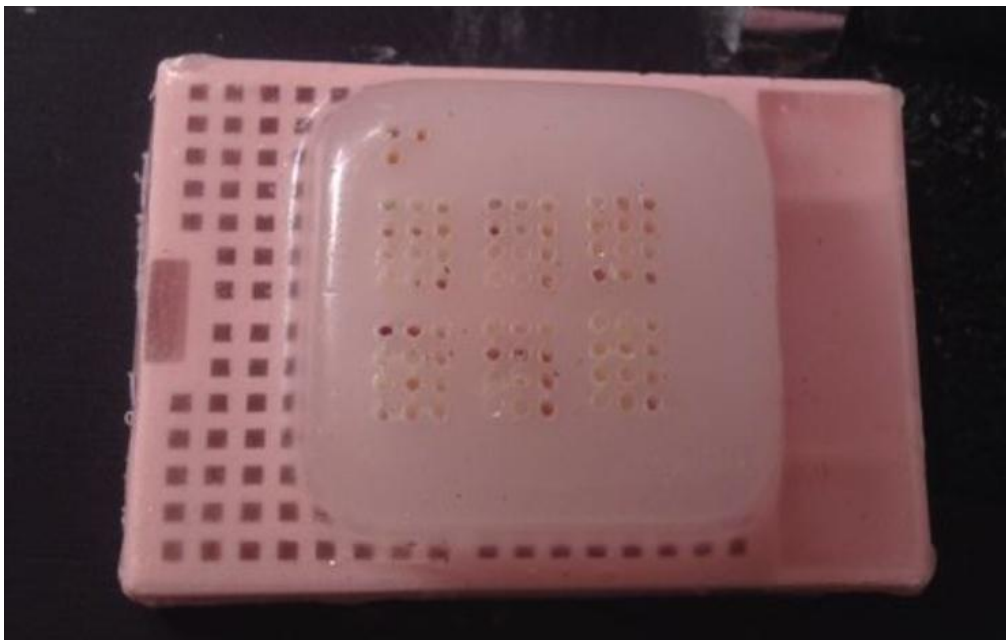


Abbildung 6: Fertiger, gestanzter TMA-Block
Zur Orientierung wurde oben links in den Paraffinblock Plazenta- oder Lebergewebe eingebracht.

2.7.3 Immunhistochemie

Seit den späten 1970er Jahren ist die Immunhistochemie eine gut etablierte und vielseitige Technik, die routinemäßig in der molekularen und diagnostischen Pathologie zur Identifizierung und Lokalisierung von zellgebundenen Antigenen zum Einsatz kommt [217, 219].

Die Immunfärbung wurde in dieser Arbeit mit dem polyklonalen Primärantikörper gegen CD147 (Abcam, Cambridge, United Kingdom; Verdünnung 1:5000) durchgeführt. Die Validierung dieses Antikörpers gegen CD147 erfolgte durch den unter Abschnitt 2.3 beschriebenen siRNA vermittelten Knockdown in den vier Nierenzellkarzinom-Zelllinien und die sich daran anschließenden Western-Blot-Untersuchungen.

Die TMA-Gewebeschnitte wurden durch Methanol (100 %) auf den Objektträgern fixiert. Es folgte die Entparaffinisierung der Gewebeschnitte mittels Microclear, einem xylolähnlichen Lösungsmittel und anschließend die Rehydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe (Ethanol 100 %, 96 %, 70 %, für je 3 min). Hierauf schloss sich ein 2 - 3maliges Spülen in TBST-Puffer an.

Die durch die vorangegangene Bearbeitung des Gewebes mit Formalin und Paraffin verlorengewandene Immunreaktivität wurde durch Antigendemaskierung mittels Anwendung der Target Retrieval Solution (pH 6; Verdünnung 1:10) für 30 min wiederhergestellt. Zuvor erfolgte eine Vorbehandlung im Dampftopf. Im Anschluss wurde den Objektträgern mit den Gewebeschnitten ca. 20 min Zeit zum Abkühlen gelassen. Die Objektträger mit den Geweben wurden daraufhin nochmals in TBST-Puffer gespült. Die Blockierung der endogenen Peroxidase wurde durch eine Inkubation mittels Peroxidase Block (0,03 % H₂O₂) für 10 min erreicht. Es folgte ein 2 - 3maliges Spülen in TBST-Puffer. Danach wurden die Objektträger mit dem Primärantikörper gegen CD147 für 1 h bei RT in einer Verdünnung von 1:5000 in PBS inkubiert.

Die Detektion der Antikörperbindung wurde durch Anwendung des Kits Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark) ermöglicht. Ein Bestandteil dieses Kits ist das

Dako REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse (ENV), ein mit Peroxidase- und sekundären Ziegenantikörpermolekülen, die sich gegen die Immunglobuline des Kaninchens und der Maus richten, gekoppeltes Dextran. Hiervon wurden circa 100 µl aufgetragen und für 30 min inkubiert. Es folgte wieder ein 2 - 3maliges Spülen in TBST. Die im Kit enthaltene konzentrierte Diaminobenzidinlösung (Dako REAL™ DAB+ Chromogen; 20 µl) wurde mit dem ebenfalls enthaltenen wasserstoffperoxidhaltigen Substratpuffer (Dako REAL™ Substrate Buffer; 1 ml) verdünnt. Hiervon wurden dann circa 100 µl auf die Gewebeschnitte gegeben und nach 10 min für etwa 3 min unter fließendem Leitungswasser gespült.

Es schloss sich eine Gegenfärbung für ca. 10 sec mit filtriertem Hämalaun an, um auf diese Weise die Kerne anzufärben und dadurch eine gute Orientierung in den Schnittpräparaten zu gewährleisten. Daraufhin wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten wieder für 3 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Schließlich wurden die Objektträger mit den gefärbten TMA-Schnitten durch eine aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol 70 %, 96 %, 100 % für je 3 min) dehydriert und zur Fixierung für 5 min mit Microclear behandelt. Die überschüssige Flüssigkeit wurde abgewischt und es folgte das Eindeckeln mittels Deckglas.

Die Kohorten 1 und 3 wurden immunhistochemisch durch eine Medizinisch-technische Assistentin des Pathologischen Instituts der Universitätsklinik Tübingen an einem Färbeautomat gefärbt. Die optimale Konzentration des primären Antikörpers wurde in Verdünnungsreihen auf Testgeweben mit großen Gewebebereichen bestimmt. Positive und negative Kontrollen gewährleisteten die gleichbleibende Qualität der Immunfärbung.

Im IKP Stuttgart erfolgten zusätzliche Gewebefärbungen mit dem Antikörper gegen CD147. Diese wurden ohne die Verwendung eines Färbeautomaten durchgeführt, erhielten jedoch keinen Einzug in diese Arbeit.

2.7.4 Semi-quantitative Auswertung

Klassischerweise wird die Auswertung von immunhistochemischen Färbungen am Mikroskop durchgeführt [224]. Jedoch stößt der Begutachter bei der mikroskopischen Auswertung der großen Anzahl an Gewebebereichen auf den TMAs an Grenzen. Deshalb wurden hier die Objektträger mit den für CD147 gefärbten TMA-Schnitten mittels des Objektträger-Scanners Mirax Scanner (Carl Zeiss, Micro-Imaging, Göttingen, Deutschland) bei 20facher Vergrößerung digitalisiert. Im Anschluss wurde die membranöse Expression von CD147 unter Verwendung der bildbasierten Software Mirax Viewer 1.12 (Carl Zeiss, Light Microscopy, Göttingen, Deutschland) semiquantitativ bewertet. Diese Software ermöglicht ein Arbeiten am Computer wie am Mikroskop bei Vergrößerungen von 10x, 20x, 40x oder 60x bei jedoch besserem Überblick.

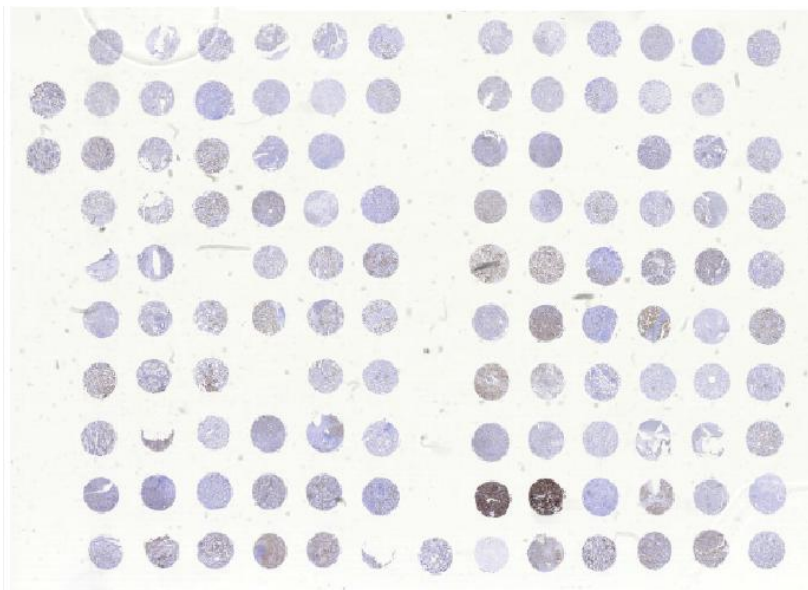


Abbildung 7: Übersichtsbild eines immunhistochemisch gefärbten TMAs mittels der Software Mirax Viewer

Färbung für CD147 (Verdünnung 1:5000, keine Vergrößerung)

Die Quantifizierung der Immunfärbungen vom jeweiligen Tumor- und benignen Nierengewebe wurde verblindet (ohne Wissen der klinischen Details zu den Patienten) und unter Anleitung und ständigem Feedback durch den Pathologen Dr. med. M. Scharpf durchgeführt. Unklare Gewebefärbungen wurden gemeinsam ausgewertet. Die Färbeintensität von CD147 wurde auf einer

Punkteskala von 0 bis 3, passend zur Färbungsstärke von negativ (0), schwach (1), moderat (2) bis stark (3) angegeben. Durch Multiplizieren der Färbeintensität mit dem prozentualen Anteil positiv angefarbter Tumorzellen (0 - 100 %) wurde der zusammengesetzte IHC-Score errechnet. Diese IHC-Scorewerte zwischen 0 - 300 wurden anschließend in eine prozentuale Proteinexpression (0 - 100 %) umgerechnet und schließlich aus den beiden pro Patient vorhandenen Tumorstanzen der Mittelwert gebildet. Repräsentative Beispiele der unterschiedlichen IHC-Färbungen des klarzelligen Nierenzellkarzinoms und des normalen Nierengewebes werden in den Abbildungen 9, 10 und 11 im Ergebnisteil dargestellt.

Diese manuellen Auswertungssysteme führen jedoch oft zu einer Variabilität zwischen den Betrachtern [219, 223]. Außerdem basieren sie eher auf einem morphologischen Vergleich der Gewebe als auf einer unabhängigen Bewertung der wahren Färbeintensität und der Zuweisung von exakten Werten und damit einer kontinuierlichen Messung der Proteinexpression [218, 224].

2.7.5 Automatisierte Auswertung mit der Software Tissue Studio

Es zeigte sich hier folglich ein klarer Bedarf für eine quantitative Methode, um so die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit bei der Beurteilung von immunhistochemischen Färbungen zu sichern und dadurch das Verfahren der Immunhistochemie zu standardisieren [219].

Für die automatisierte Auswertung der Proteinexpression von CD147 wurde das Software-basierte Bildanalyse-Programm Tissue Studio v.3.6 (Definiens AG, München, Deutschland) angewendet. Tissue Studio erlaubt dem Anwender die Quantifizierung von Bildern der Breitfeld-Immunhistochemie und Immunfluoreszenz. In der Software enthalten ist TissueMap 3.0, ein Arbeitsinstrument zur automatisierten Quantifizierung von Biomarkern im Kern, in der Membran und im Zytoplasma, das für komplette Gewebeschnitte und für TMAs verwendet werden kann. In einem mehrstufigen Algorithmus bearbeitet die Software die eingescannten Bilder der Gewebe auf den Objektträgern und führt eine quantitative, kontinuierliche Messung der immunhistochemischen Färbung an der Zellmembran durch.

Hierbei wurde nach dem Handbuch des Herstellers vorgegangen. Gestartet wurde der Arbeitsprozess durch Wählen des Portals Definiens Tissue Studio (TMA), das für Analyse von TMAs mit immunhistochemischen Bildern (Breitfeld) empfohlen wird. Anschließend folgte das Importieren der eingescannten TMA-Objektträger. Zu Beginn konnten die TMA-Cores mit einem vorgegebenen oder neu erstellten benutzerdefinierten Raster durch Einstellen der Reihen und Spalten der Gewebestanzungen, Festlegung der positiven Cores und Markieren der leeren Plätze automatisch detektiert und deren Position im Gitterlayout zugeordnet werden. Die Ergebnisse der automatischen Core-Detektion und des Matchings konnten manuell bearbeitet werden, indem die Cores entweder manuell hinzugefügt oder deren "Region of Interest" (ROI) verändert wurden. Ferner konnten die Cores entfernt werden, die aus dem Matching-Prozess und der anschließenden Auswertung ausgeschlossen werden sollten. Mit Hilfe des über den Cores liegenden Rasters konnten Anmerkungen, beispielsweise die Patientenummer, aus einer csv.Datei hochgeladen und diese dazu abgespeichert werden.

Es wurde die vordefinierte Analyseoption "Nuclei, Membranes and Cells" mit den Funktionen "ROI detection, nucleus and membrane detection and cell classification" verwendet. Sog. "Regions of interest" (ROI) wurden ausgewählt, um zwischen Tumorgewebe (entweder IHC positiv oder negativ) und beispielsweise Bindegewebe oder eingebluteten Regionen zu unterscheiden. In einem nachfolgenden Trainingsmodus konnte der Software anhand von maximal 12 manuell ausgewählten Cores bis zu 8 verschiedene Kategorien erlernt werden. Hier wurden die Klassen Tumorgewebe "Tumor positiv" oder "Tumor negativ", "Bindegewebe" und "Einblutung" namentlich gewählt und ihnen eine Farbe zugeordnet. Die Trainingsbilder wurden dann von der Software in Segmente unterteilt, deren Segmentierung angepasst werden konnte, wenn eine andere Skala vorteilhafter erschien. Die jeweils zu den Klassen passenden Segmente wurden auf den Trainingsbildern angeklickt, diese füllten sich mit der jeweiligen Farbe. Im anschließenden Schritt wendete die Software die eingezeichneten, festgelegten Bereiche auf die bis zu 12 Trainingsbilder an. Das Einteilungsschema der Software konnte anhand der

gewählten Trainingsbilder bewertet und somit überprüft werden, ob es mit dem zugrundeliegenden Gewebe übereinstimmte. Gegebenenfalls konnte die Segmentwahl angepasst und verbessert werden, bis die von der Software gewählte Einteilung in "Tumor positiv", "Tumor negativ", "Bindegewebe" und "Einblutung" mit dem Originalbild histologisch übereinstimmte.

Für die weiteren Analysen wurden die Stanzbereiche (Cores) mit normalem Nierengewebe ausgeschlossen und nur die Cores, die das Tumorgewebe enthielten, verwendet. Schwellenwerte für die nukleäre und membranöse Erkennung wurden hinzugefügt und diese konnte wieder durch Abgleich der Trainingsbilder mit dem histologischen Grundbild angepasst werden. Die detektierten Zellen wurden entsprechend ihrer immunhistochemischen Färbeintensität in "negativ", "niedrig", "moderat" und "stark" subklassifiziert. Die Schwellenwerte wurden nochmals durch Ansicht der Trainingsbilder verifiziert.

Dementsprechend besteht das zugrundeliegende Prinzip darin, dass eine spezifische Maske durch Festlegung von Schwellenwerten eines Markers auf den Bildern hergestellt wird, um so Tumor und umliegendes Stroma und beispielsweise eingeblutete Bereiche zu unterscheiden. Auf diese Weise wurde die Anzahl an Marker-exprimierenden (hier CD147) und Marker-nicht-exprimierenden Tumorzellen pro TMA-Core digital gezählt und in verschiedenen starke Expressionsstufen eingeteilt.

Als nächster Schritt wurde das Analyseprogramm gestartet, welches dann über alle davor in den Arbeitsspeicher geladene Bilder lief. Beim voreingestellten Exportvorgang entstanden csv-Dateien mit Informationen zu jedem Core. Dabei konnten alle gesammelten Daten für die sich später anschließende Datenverarbeitung nach Excel exportiert werden. Außerdem wurden von jedem Core des TMA die Screenshots der ROIs, detaillierte Analysebilder der eingezeichneten Kerne und Membranen sowie die Unterteilung in Klassen anhand der unterschiedlichen Farben abgespeichert. Nach dem Analysedurchlauf konnten die separat abgespeicherten Bilder begutachtet und die Ergebnisse zahlenmäßig in Tabellen sowie anhand der Bilder analysiert werden.

Der Tissue-Studio-Score (Score_{TS}) wurde aus der Anzahl der Zellen in der Tumorregion (IHC "positiv" und "negativ"), multipliziert mit ihrer Färbeintensität und dividiert durch die Anzahl aller detektierten Zellen in der Tumorregion gebildet.

$$\text{Score}_{TS} = \frac{\text{IHCneg}(\#neg \times 0 + \#low \times 1 + \#med \times 2 + \#high \times 3) + \text{IHCpos}(\#neg \times 0 + \#low \times 1 + \#med \times 2 + \#high \times 3)}{\#IHCneg + \#IHCpos}$$

Formel 1: Formel zur Berechnung des Tissue-Studio-Score (Score_{TS})

2.8 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden durch den Mathematiker S. Winter am IKP in Stuttgart erstellt und für diese Arbeit zum Großteil aus dem Paper (Fisel et al. 2015) [225] übernommen. Teilweise wurden die Analysen bearbeitet und angepasst.

Für die statistischen Analysen wurde die Software R-3.1.2 (<http://www.r-project.org>) [226] mit den zusätzlichen Softwarepaketen boot_1.3-15 [227], party_1.0-20 [228] und survival_2.37-7 [229] genutzt. Zudem wurde das Programm GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.) angewendet. Statistische Signifikanz wurde definiert als $P < 0,05$.

Die Korrelationsanalysen für den Zusammenhang zwischen dem manuell-berechneten Score der Proteinexpression von CD147 und dem Software-basierten Score (Score_{TS}) wurden durch Ermittlung des Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten durchgeführt.

Die Signifikanz der Unterschiede in der Ausprägung der Expression von CD147 auf mRNA- und Proteinebene zwischen dem Nierentumor- und dazugehörigem tumorfreien Normalgewebe wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests untersucht.

Als Endpunkt für die Überlebenszeitanalysen wurde das tumorabhängige Überleben der Patienten gewählt. Für die Berechnung des tumorspezifischen Überlebens der Patienten wurde als Anfangspunkt für die Kohorten 1 und 3 der Operationszeitpunkt und für die Kohorte 2 (TCGA) der Zeitpunkt der pathologischen Diagnose gewählt. Statistischer Endpunkt war für alle 3 Kohorten der Zeitpunkt des letzten Follow-ups oder der zeitlich vermerkte Tod. Die Cutoffs der Expressionshöhe von CD147 auf mRNA- oder Proteinebene zur Vorhersage des tumorabhängigen Überlebens wurden mit einem rekursiven Partitionsalgorithmus (Conditional Inference Trees) bestimmt. Für die resultierenden Cutoffs wurden Kaplan-Meier-Analysen durchgeführt. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Überlebenskurven wurde mittels eines Logrank-Tests evaluiert. Zusätzlich wurden die Hazard Ratios berechnet. Um den Zusammenhang des tumorabhängigen Überlebens der Patienten mit den Variablen der DNA-Methylierung, mRNA-Expression, Proteinexpression, klinischen Parameter oder des prognostischen SSIGN-Scores zu analysieren, wurden proportionale Cox-Regressionsmodelle, auch als proportionales Hazard Modell bezeichnet, verwendet. Die entsprechenden Harrells c-Indices wurden basierend auf 1000 Bootstrap-Replikaten berechnet. Der Vergleich der Cox-Modelle erfolgte mittels einer Devianz-Analyse.

Die Expressionsdatensätze (Illumina HiSeq2000; TCGA_KIRC_exp_HiSeqV2-2015-02-24) der Proben des klarzelliges Nierenzellkarzinoms von The Cancer Genome Atlas (TCGA, Kohorte 2) wurden am 15. Mai 2015 vom „Cancer Genome Browser“ (<https://genome-cancer.soe.ucsc.edu>) heruntergeladen. Die Datensätze enthielten ebenfalls Follow-up-Daten. Die klinischen Daten und Follow-up-Daten der Kohorte 2 wurden zusätzlich direkt vom TCGA-Datenportal (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga>; nationwidechildrens.org/clinical_follow_up_v1.0_kirc.txt und nationwidechildrens.org/clinical_patient_kirc.txt; Version 2.0.25.0May 2015) heruntergeladen und untersucht. Für 530 primäre Proben des klarzelliges Nierenzellkarzinoms und 208 tumorumgebendes normales Nierengewebe waren sowohl die klinischen Daten vom TCGA-Datenportal, als auch die Expressionsdaten verfügbar. Davon waren bei 529 primären Proben

des klarzelligem Nierenzellkarzinoms und bei 72 tumorumgebenden normalen Nierengewebe Expressionsdaten verfügbar.

In der Kohorte 2 wurde das krebsabhängige Überleben nach *Gulati et al.* [230] definiert, wobei das längste Follow-up aus den oben genannten Datenquellen verwendet wurde. Bei widersprüchlichen Angaben wurde die Angabe auf NA (nicht vorhanden) gesetzt. Dementsprechend wurden 510 primäre Fälle mit einem klarzelligem Nierenzellkarzinom für die Überlebensanalysen mit Hilfe der Expressionsdaten verwendet.

3. Ergebnis

3.1 Patientenkohorten

Es wurden insgesamt 165 Männer (64 %) und 80 Frauen (36 %) mit einem zum Operationszeitpunkt durchschnittlichen Alter von 64 Jahren (Spanne von 17 - 90 Jahren) in die Studienpopulation eingeschlossen. Das Geschlechterverhältnis von männlich zu weiblich betrug in etwa 2 zu 1. Die Studienpopulation enthielt als histologischen Subtyp nur das klarzellige Nierenzellkarzinom. Von den 245 klarzelligem Nierenzellkarzinomen zeigten 12 Fälle eine sarkomatoide Differenzierung und 76 wiesen eine Nekrose im Tumorareal auf. Die durchschnittliche Tumorgröße lag bei 4,95 cm. Die Analyse ergab, dass 163 Patienten (63,5 %) einen Tumor im Stadium T1 und 82 Patienten (36,5 %) einen Tumor im höheren Stadium (T2: 6; T3: 76; T4: 0) hatten. Keiner der Patienten erhielt eine neoadjuvante Therapie im Sinne einer Chemo-, Immun- oder Radiotherapie.

Zum Zeitpunkt der Operation wurde in den Kohorten 1 und 3 bei 31 Patienten (13,55 %) ein metastatischer Befall gefunden.

Während des Beobachtungszeitraums kam es bei 56 Patienten (22 %) zu einem Rezidiv. Die mediane Follow-up Zeit betrug 6,25 Jahre. (Spanne 0 bis 19,2 Jahre) In dieser beobachteten Zeit verstarben von den 245 in die Studie eingeschlossenen Patienten 38 (14,85 %) bedingt durch das Nierenzellkarzinom.

Die detaillierten klinisch-pathologischen Patientencharakteristika der beiden untersuchten Kohorten (Kohorte 1 und 3) sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Tabelle 21: Detaillierte Patientencharakteristika der 3 untersuchten Kohorten.

Die Tabelle wurde aus dem Paper (Fisel et al. 2015) [225] übernommen und bearbeitet.

Variable		Kohorte 1		Kohorte 2 (TCGA)		Kohorte 3	
		n	%	n	%	n	%
Anzahl der Patienten		186		530		59	
Geschlecht	m	131	70,4	342	64,5	34	57,6
	w	55	29,6	188	35,5	25	42,4
Alter^a [Jahre] median (Bereich)		64	17-90	61	26-90	64	35-87
Tumorgroße [cm] median (Bereich)		4,4	0,3-12,5	-	-	5,5	1,4-16
T	1	129	69,4	270	50,9	34	57,6
	2	0	0	69	13	6	10,2
	3	57	30,6	180	34	19	32,2
	4	-	-	11	2,1	-	-
N	0	183	98,4	238	44,9	52	88,1
	1	3	1,6	17	3,2	7	11,9
	X	-	-	275	51,9	-	-
M	0	164	88,2	423	79,8 ^b	50	84,7
	1	22	11,8	79	14,9 ^b	9	15,3
	X	-	-	26	4,9 ^b	-	-
G	1	31	17,7	13	2,5 ^b	13	22
	2	133	71,5	228	43 ^b	38	64,4
	3/4	22	11,8	281	53 ^b	8	13,6
	X	-	-	5	0,9 ^b	-	-
L	0	180	96,8	-	-	56	94,9
	1	6	3,2	-	-	3	5,1
V	0	144	77,4 ^c	-	-	44	74,6
	1	41	22 ^c	-	-	14	23,7
	2	1	0,5 ^c	-	-	1	1,7

		Kohorte 1		Kohorte 2 (TCGA)		Kohorte 3	
R	0	174	93,5 ^b	-	-	55	93,2
	1	11	5,9 ^b	-	-	4	6,8
Tumornekrose	Nein	118	63,4	269	50,8 ^b	51	86,4
	Ja	68	36,6	230	43,4 ^b	8	13,6
Sarkomatoide Differenzierung	Nein	178	95,7	-	-	55	93,2
	ja	8	4,3	-	-	4	6,8
Follow-up-Zeitraum [Jahre]		8	0-19,2	3,01	0-10,4	4,5	0-7,3
Rezidiv	Nein	142	76,3	-	-	47	79,7
	Ja	44	23,7	-	-	12	20,3
Gesamtüberleben	Lebend	119	64	363	68,5 ^b	49	83,1
	Verstorben	67	36	153	28,9 ^b	10	16,9
Tumorspezifisches Überleben	Lebend/ Tumor- unabhängiger Tod	156	83,9	411	77,5 ^b	51	86,4
	Tumorabhängiger Tod	30	16,1	100	18,9 ^b	8	13,6

Abkürzungen:

T: Primärtumor; N: Regionale Lymphknoten; M: Fernmetastasen; G: Grading;

L: Invasion in Lymphgefäße; V: Invasion in Venen; R: Residualtumor

^aAlter zum Operationszeitpunkt für Kohorte 1 und 3, Alter bei pathologischer Diagnose für Kohorte 2

^b Prozentualer Anteil summiert sich aufgrund von fehlenden Variablen nicht auf 100 %,

^c Prozentualer Anteil summiert sich aufgrund von Rundungsdifferenzen nicht auf 100 %,

3.2 Evaluation der Proteinexpression von CD147

3.2.1 Resultate der Expression von CD147 im Tumor- und tumorfreien Normalgewebe mittels manueller Auswertung

Die Proteinexpression von CD147 wurde durch immunhistochemische Färbungen an den TMAs der Kohorte 1 und 3 untersucht. Die manuelle semi-quantitative Auswertung erfolgte mit der Software Mirax Viewer, die eine Sichtung und Auswertung der immunhistochemischen Färbungen am Computer wie am Mikroskop ermöglicht und dabei eine bessere Übersicht auf den TMAs bietet. Zur Veranschaulichung der verwendeten Software siehe Abbildung 8.

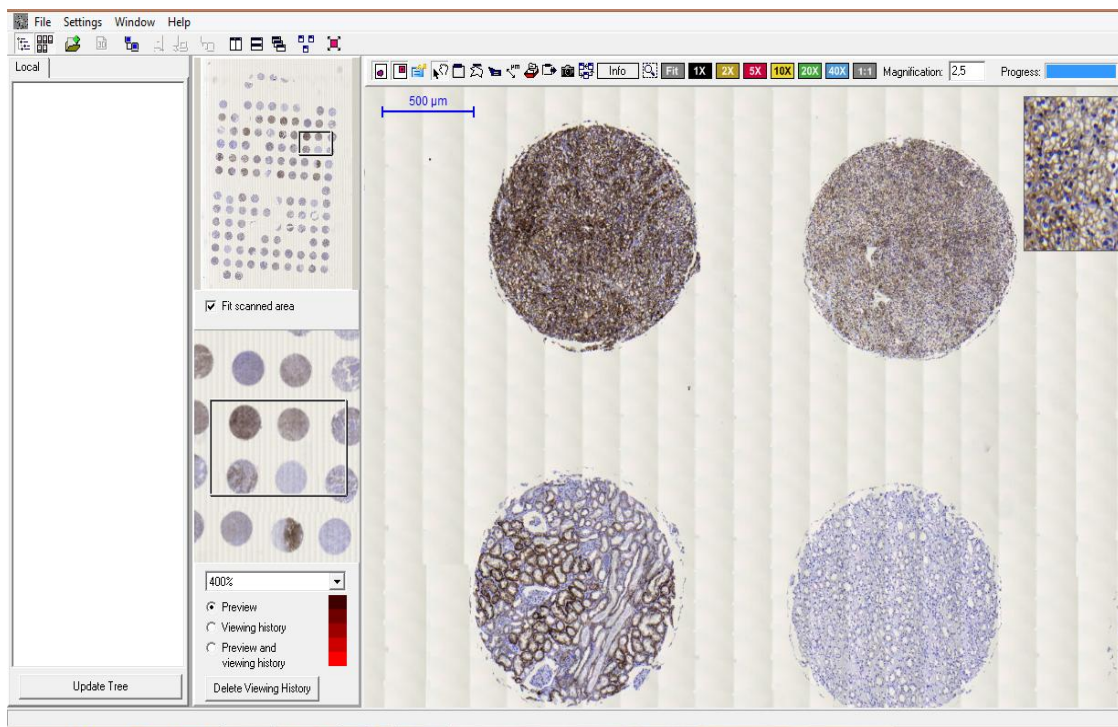


Abbildung 8: Übersichtsbild der verwendeten Software Mirax Viewer

Repräsentative immunhistochemische Färbegergebnisse mit starker Expression für CD147 in den Tumorbereichen mit darunter dazugehörigem tumorfreiem Normalgewebe (CD147-AK, Verdünnung 1:5000, 2,5fache Vergrößerung)

Links oben: Übersicht des TMAs.

Rechts oben: Repräsentative Tumorstanzen von 2 unterschiedlichen Patienten, darunter jeweiliges dazugehöriges tumorfreies Normalgewebe.

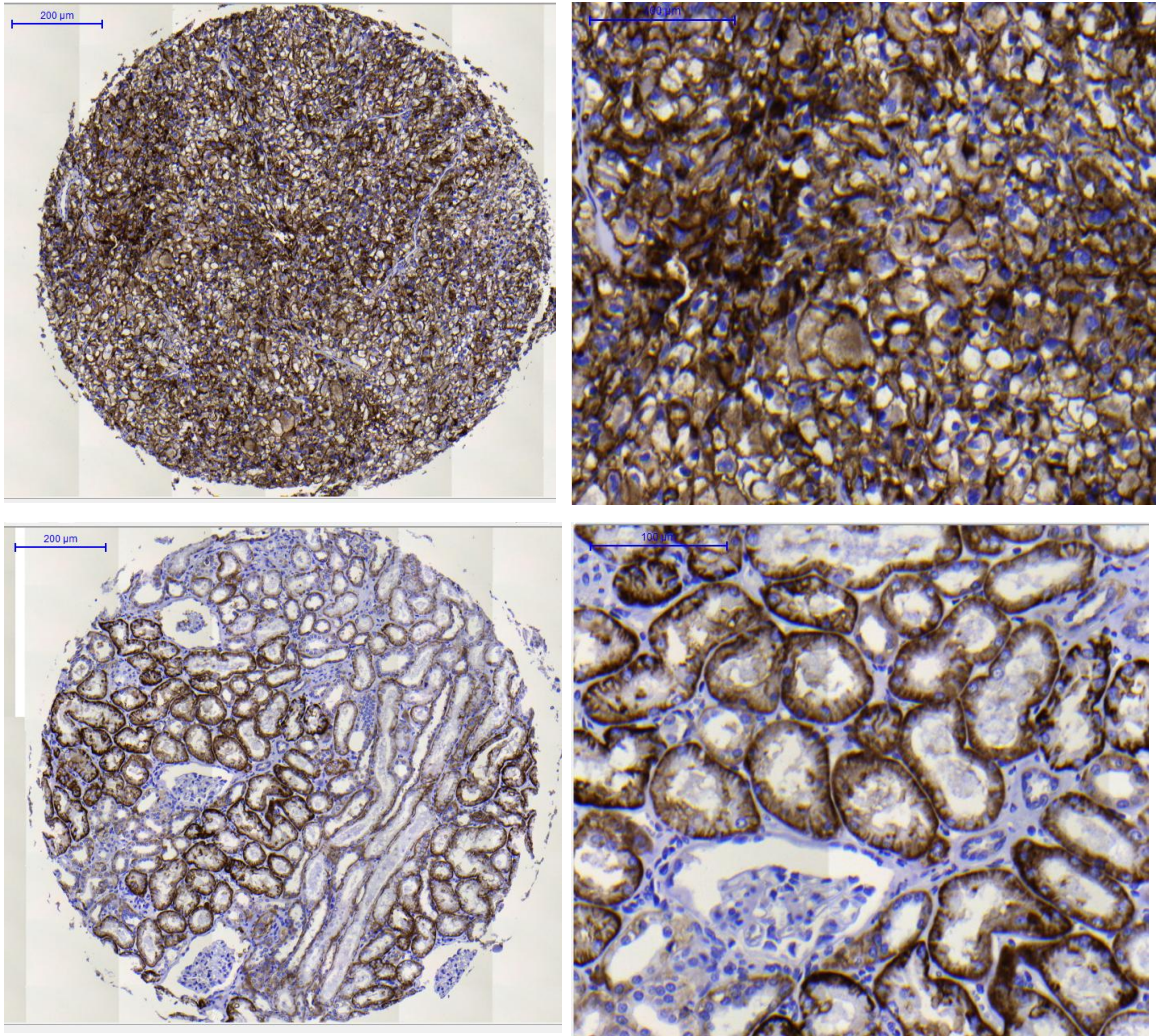


Abbildung 9: Detaillierte Aufnahmen des linken Tumor- und korrespondierenden Normalgewebes aus Abbildung 8 (CD147-AK, Verdünnung 1:5000)

Links oben: Tumorstanze links mit starker Anfärbung für CD147 (7fache Vergrößerung)

Rechts oben: Tumorstanze links im Detail (20fache Vergrößerung)

Links unten: Normalgewebe links mit teilweise starker Expression für CD147 (7fache Vergrößerung)

Rechts unten: Normalgewebe links im Detail (20fache Vergrößerung)

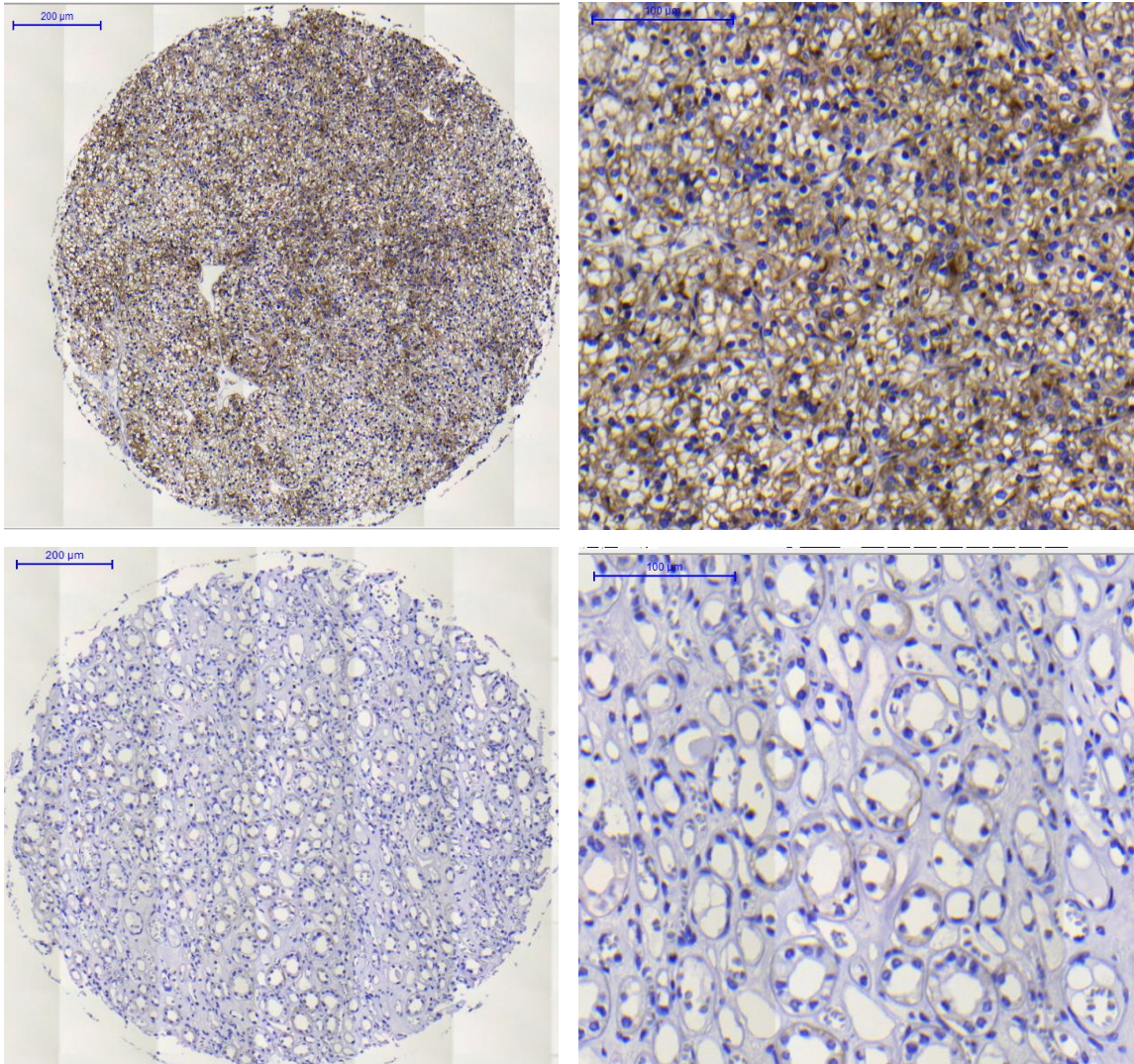


Abbildung 10: Detaillierte Aufnahmen des rechten Tumor- und korrespondierenden Normalgewebes aus Abbildung 8 (CD147-AK, Verdünnung 1:5000)

Links oben: Tumorstanz rechts mit moderater Anfärbung für CD147 (7fache Vergrößerung)

Rechts oben: Tumorstanz rechts im Detail (20fache Vergrößerung)

Links unten: Normalgewebe rechts ohne Anfärbung für CD147 (7fache Vergrößerung)

Rechts unten: Normalgewebe rechts im Detail (20fache Vergrößerung)

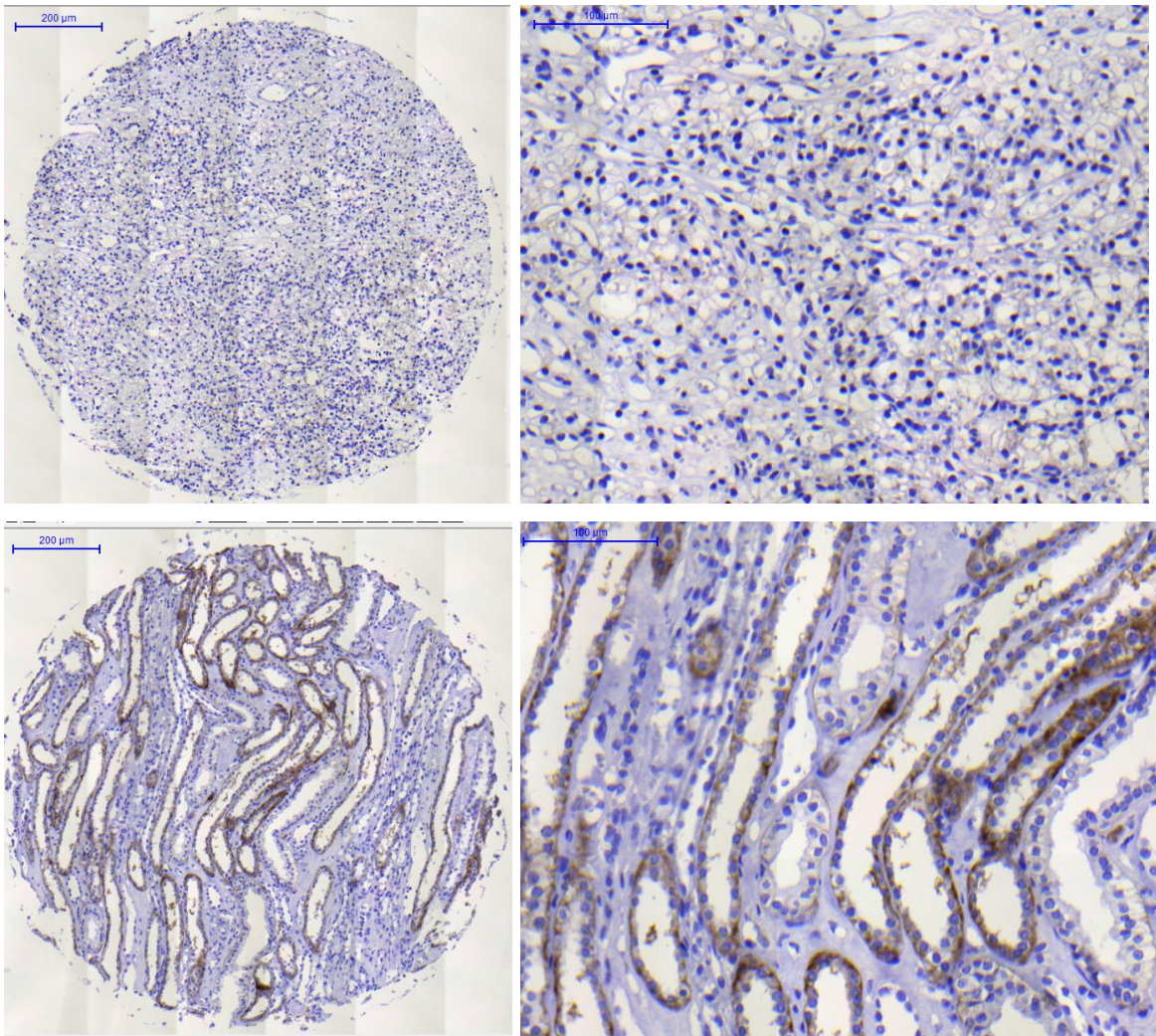


Abbildung 11: Repräsentative immunhistochemische Färbungen von CD147 im Tumorgewebe mit niedriger Expression und korrespondierendes tumorfreies Normalgewebe

Links oben: Tumorstanze ohne Anfärbung für CD147 (7fache Vergrößerung):

Rechts oben: Tumorstanze im Detail (20fache Vergrößerung):

Links unten: Normalgewebe mit schwacher Expression für CD147 (7fache Vergrößerung)

Rechts unten: Normalgewebe im Detail (20fache Vergrößerung)

Die meisten Tumorzellen zeigten eine zirkuläre membranöse Färbung für CD147. Auch wenn einige Tumorzellen eine zytoplasmatische Färbung aufwiesen, wurde nur die Färbung an der Membran quantifiziert. Im tumorfreien Normalgewebe war eine Anfärbung an der basolateralen Membran der epithelialen Zellen des proximalen und distalen Tubulus zu beobachten.

Die Abbildungen 9, 10 und 11 stellen repräsentative immunhistochemische Färbungen von CD147 im Tumorgewebe mit zum Teil starker, aber auch ebenso schwacher bzw. negativer Expression für CD147 dar. Mit abgebildet ist auch das jeweilige dazugehörige tumorfremie Normalgewebe, das sich teilweise stark positiv, jedoch auch negativ bzw. sehr schwach für CD147 angefärbt zeigte. Die Abbildungen sollen demnach die starke interindividuelle Variabilität in der Expression von CD147 im Tumor-, aber auch normalen tumorfremien Nierengewebe beispielhaft aufzeigen. Diese interindividuelle Variabilität spiegelte sich auch in dem semi-quantitativ berechneten Score wider. Dieser berechnete sich aus der Färbeintensität und dem prozentualen Anteil der gefärbten Zellen und wurde zur Bestimmung der Proteinexpression im Nierentumor- und benachbarten Normalgewebe herangezogen.

3.2.2 Resultate der Software-basierten Auswertung

Die Proteinexpression von CD147 im Nierentumorgewebe wurde zusätzlich zur manuellen semi-quantitativen Auswertung mit der Bildanalyse-Software Tissue Studio v.3.6 (Definiens AG) bewertet. Diese erlaubt eine automatisierte Detektion der nutzerdefinierten ROIs in den Cores und eine daran anschließende Evaluierung der Färbeintensität in spezifischen Regionen. Hier wurde dieses Verfahren ausschließlich für die Tumorregionen verwendet und das tumorfremie Normalgewebe wurde einzig manuell bewertet. Eine detaillierte Beschreibung zum Ablauf des Verfahrens wurde im Material- und Methodik-Teil dargestellt. Schließlich wurde für die Proteinexpression der Tissue-Studio-Score ($Score_{TS}$) berechnet. Die genaue Formel wurde ebenfalls im Material- und Methodik-Teil aufgeführt. Zur Überprüfung der Genauigkeit der Software-basierten Auswertung wurde der $Score_{TS}$ mit den Ergebnissen des manuell ausgewerteten und errechneten Färbescores korreliert.

In den folgenden Abbildungen 12 und 13 werden beispielhaft Auswertungen der Software Tissue Studio dargestellt. Abhängig von der Stärke der immunhistochemischen Färbung für CD147 wurde den Zellen eine unterschiedliche Farbe, von der Bandbreite keine Anfärbung über gelb, orange bis rot, zugeteilt.

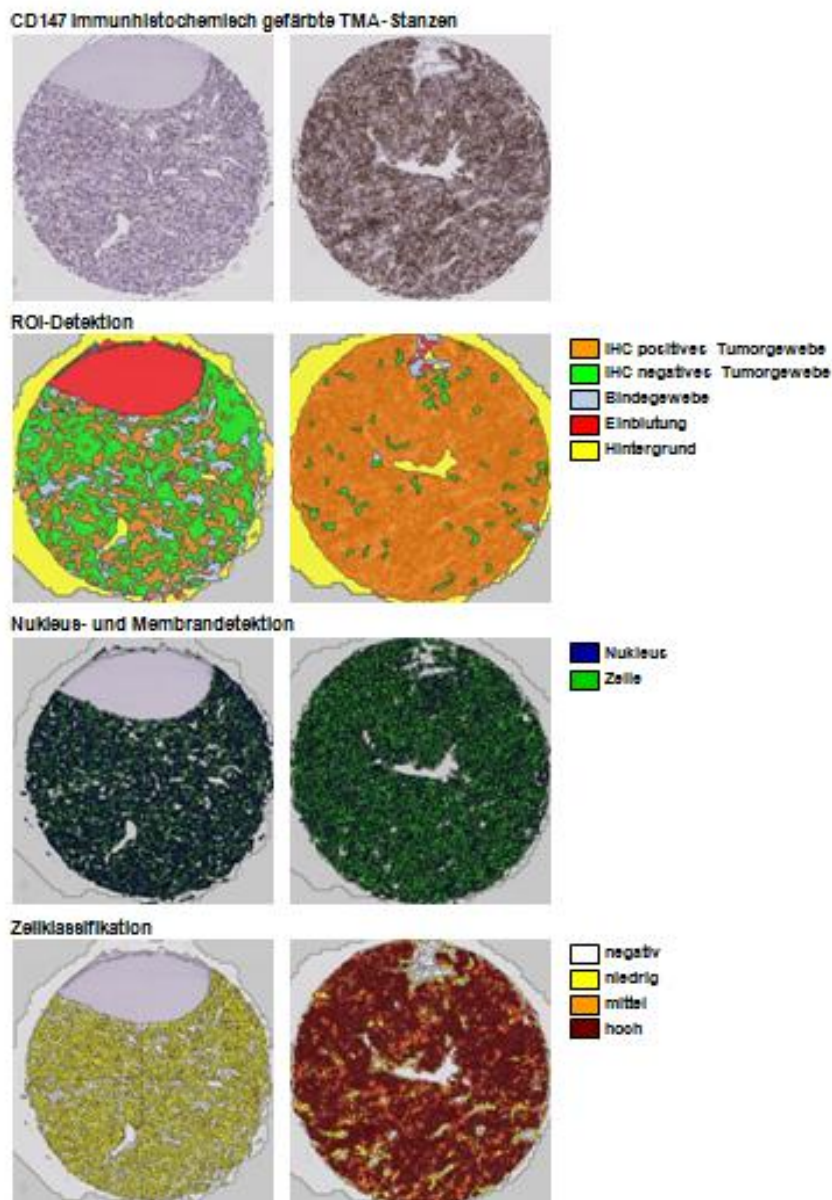


Abbildung 12: Beispiel 1 der Software-basierten Auswertung der Proteinexpression von CD147 mit Tissue Studio (Definiens AG)

Screenshots der ausgeführten Analyseoption "Nuclei, Membranes and Cells" mit den Funktionen "ROI detection, nucleus and membrane detection, and cell classification" bei 2 verschiedenen Tumorstanzen (links und rechts). Das immunhistochemisch gefärbte Ausgangsbild für die Analyse steht in der oberen Reihe und kann mit der von der Software zugeteilten Zellklassifikation mit Hilfe der Screenshots verglichen werden. Die Graphik wurde aus dem Paper (Fisel et al. 2015) [225] übernommen

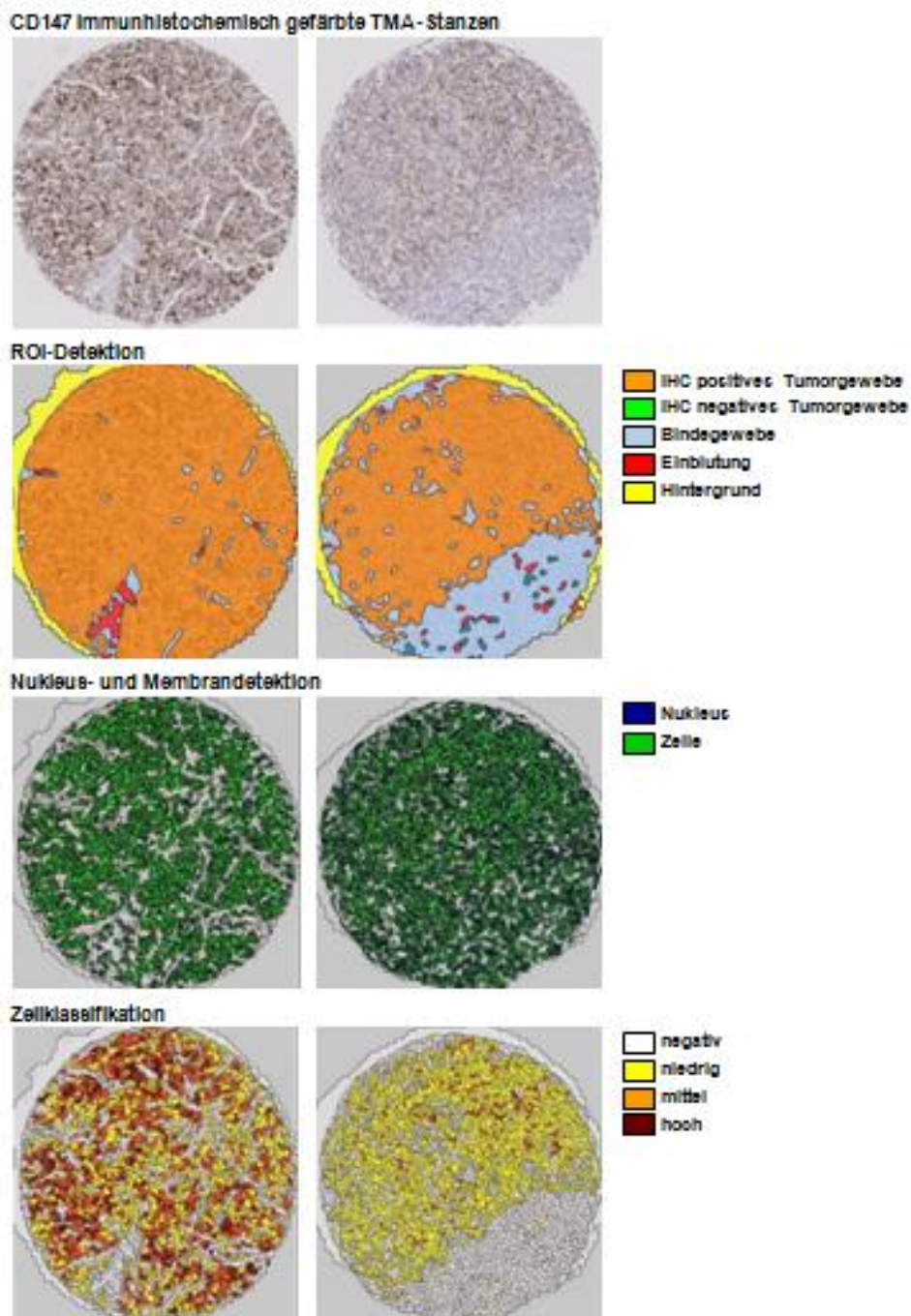


Abbildung 13: Beispiel 2 der Software-basierten Auswertung der Proteinexpression von CD147 mit Tissue Studio (Definiens AG)

Screenshots der ausgeführten Analyseoption "Nuclei, Membranes and Cells" mit den Funktionen "ROI detection, nucleus and membrane detection, and cell classification" bei 2 weiteren Tumorstanzen (links und rechts)

Die Graphik wurde aus dem Paper (Fisel et al. 2015) [225] übernommen.

In dieser Arbeit wurde demnach die manuelle und automatisierte Software-basierte Auswertung der Expression von CD147 verglichen. Wie aus der Abbildung 14 zu entnehmen ist, korrelieren der manuell- und der Software-basierte-berechnete Score (Score_{TS}) zur Ermittlung der Proteinexpression von CD147 im Nierentumorgewebe signifikant in beiden untersuchten Kohorten ($r_s=0,85$; $P<0,0001$). Aufgrund dessen wurde für die weiteren Auswertungen nur noch der von der Software-abgeleitete Score (Score_{TS}) verwendet.

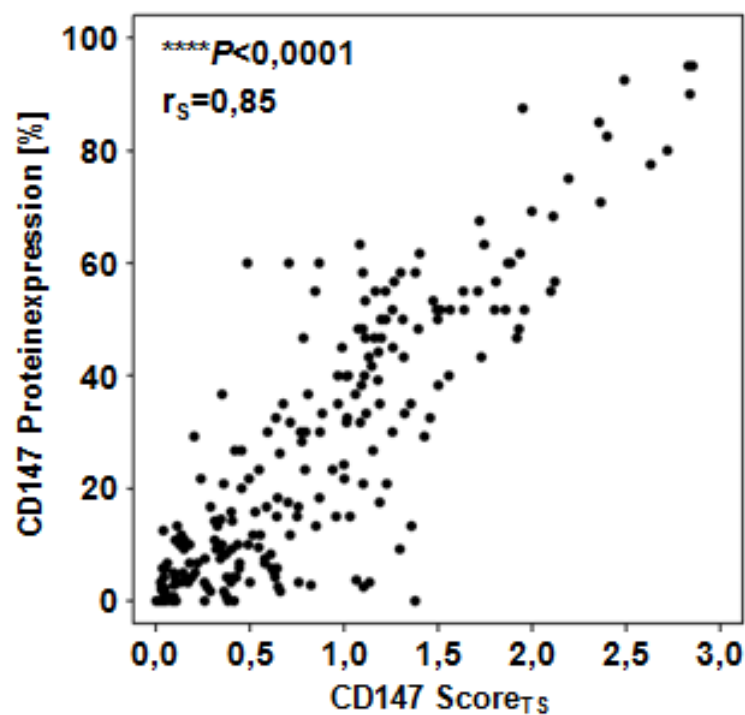


Abbildung 14: Korrelationsanalyse des manuell berechneten semi-quantitativen Proteinexpressionsscores (CD147 Proteinexpression [%]) mit dem Software-basierten Score generiert mit Tissue Studio (CD147 Score_{TS})

Die Graphik wurde aus dem Paper (Fisel et al. 2015) [225] übernommen.

3.2.3 Proteinexpression von CD147 in der Kohorte 1

Abbildung 15 zeigt die Proteinexpression von CD147 im Tumor- und korrespondierenden Normalgewebe, abgeleitet aus dem semi-quantitativen Score. Außerdem wurden die korrespondierenden Gewebe aus Tumor- und normalem tumorfreien Nierengewebe gegeneinander aufgetragen. Die durchschnittliche Proteinexpression in der Kohorte 1 lag im Gewebe des klarzelligen Nierenzellkarzinoms bei 15,4 % (Bereich: 0 - 95 %) und im Normalgewebe bei 26,7 % (Bereich: 0 - 95 %) (siehe Abbildung 15).

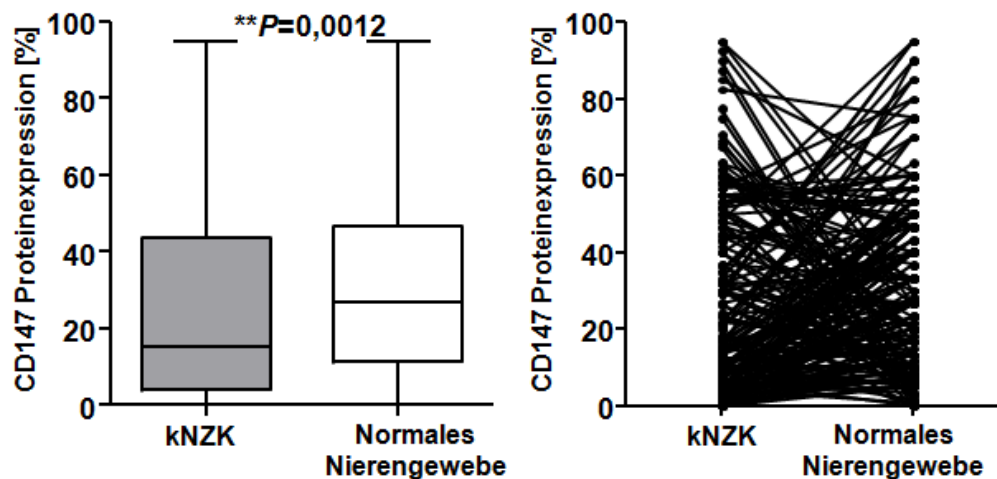


Abbildung 15: Evaluierung der Proteinexpression von CD147 im Nierentumor- und korrespondierenden tumorfreien Normalgewebe in der Kohorte 1

Das Ergebnis wurde aus dem semi-quantitativ berechneten Score abgeleitet.

Zudem Vergleich der zugehörigen Gewebepaare aus Tumor- und tumorfreien Normalgewebe.

Die CD147 Proteinexpression ist im Gewebe des klarzelligen Nierenzellkarzinoms niedriger (Median: 15,4%; Bereich: 0-95%) als im Normalgewebe (Median: 26,7%; Bereich: 0-95%).

Die Graphik wurde aus dem Paper (Fisel et al. 2015) [225] übernommen.

Die Auswertung der Proteinexpression von CD147 im Nierentumorgewebe der Kohorte 1 durch Tissue Studio zeigte, dass eine erhöhte Proteinexpression mit einem höheren Tumorstadium ($P = 1,65e^{-10}$) und dem Auftreten von Metastasen ($P = 1,44e^{-03}$) einhergeht (siehe Abbildung 16).

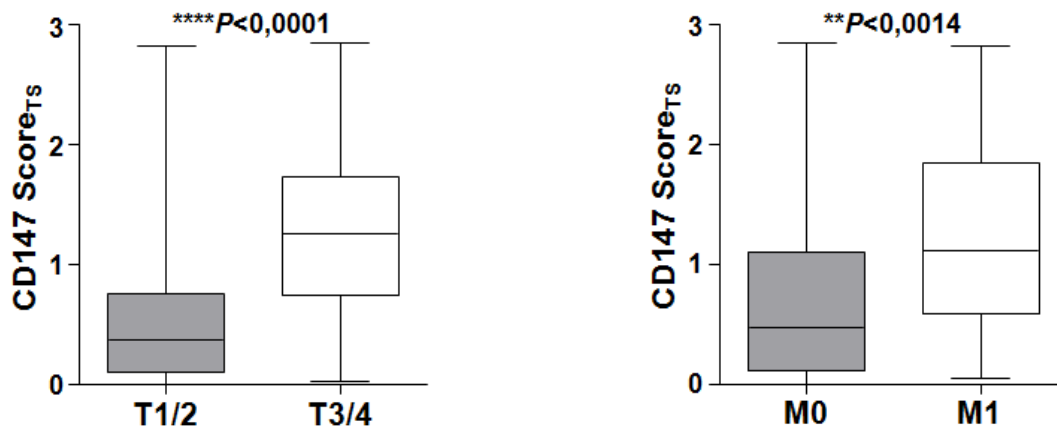


Abbildung 16: Korrelation der Proteinexpression von CD147 in der Kohorte 1 mit dem Tumorstadium bzw. mit dem Auftreten von Metastasen

Verwendet wurde der durch Tissue Studio erhobene Score_{TS}.

Eine erhöhte Proteinexpression von CD147 war mit einem höheren Tumorstadium ($P = 1,65e^{-10}$) und dem Auftreten von Metastasen ($P = 1,44e^{-03}$) assoziiert.

Die Graphik wurde aus dem Paper (Fisel et al. 2015) [225] übernommen.

Die Überlebenszeitanalyse nach dem Kaplan-Meier-Verfahren zeigte einen Zusammenhang zwischen der Höhe der Expression von CD147 und dem tumorspezifischen Überleben (CSS). Eine hohe Expression von CD147 war mit einem schlechten Tumor-abhängigen Überleben assoziiert. Diese Analyse basierte auf Grenzwerten, die durch das Konzept der Conditional Inference Trees ermittelt wurden (Hazard Ratio (HR) = 5,5, 95 % CI (2,5, 12,1); $P(\text{logrank})=2e^{-06}$, siehe Abbildung 17).

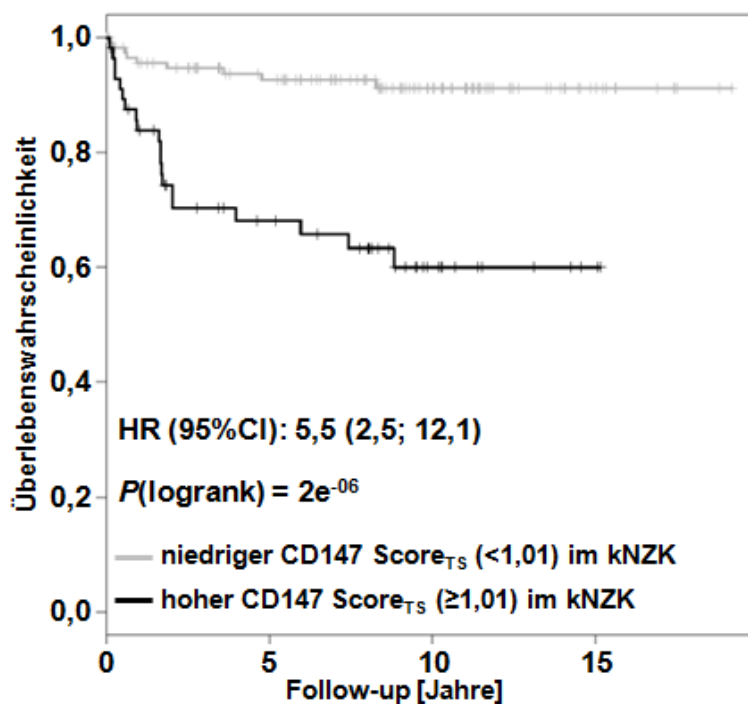


Abbildung 17: Überlebenszeitanalyse in der Kohorte 1

Überlebenszeitanalyse der Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom nach dem Kaplan-Meier-Verfahren basierend auf der Höhe der Proteinexpression von CD147 im Nierentumorgewebe der Kohorte 1.

Endpunkt war das tumorspezifische Überleben (CSS).

Grenzwerte wurden durch das Konzept der Conditional Inference Trees ermittelt.

Patienten mit einer hohen Proteinexpression von CD147 im Gewebe des klarzelligen Nierenzellkarzinoms ($\geq 1,01$) haben eine schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit als Patienten mit einer niedrigen Proteinexpression von CD147 ($< 1,01$).

Die Graphik wurde aus dem Paper (Fisel et al. 2015) [225] übernommen.

3.2.4 Proteinexpression von CD147 in der Kohorte 3

Die Proteinexpression wurde zusätzlich in der unabhängigen Kohorte 3 untersucht. Das methodische Vorgehen glich dem von Kohorte 1. Auf Proteinebene lag die durchschnittliche Proteinexpression in der Kohorte 3 im Gewebe des klarzelligen Nierenzellkarzinoms bei 26,67 % (Bereich: 0 - 80 %) und im Normalgewebe bei 40 % (Bereich: 3,33 - 90 %) (siehe Abbildung 18).

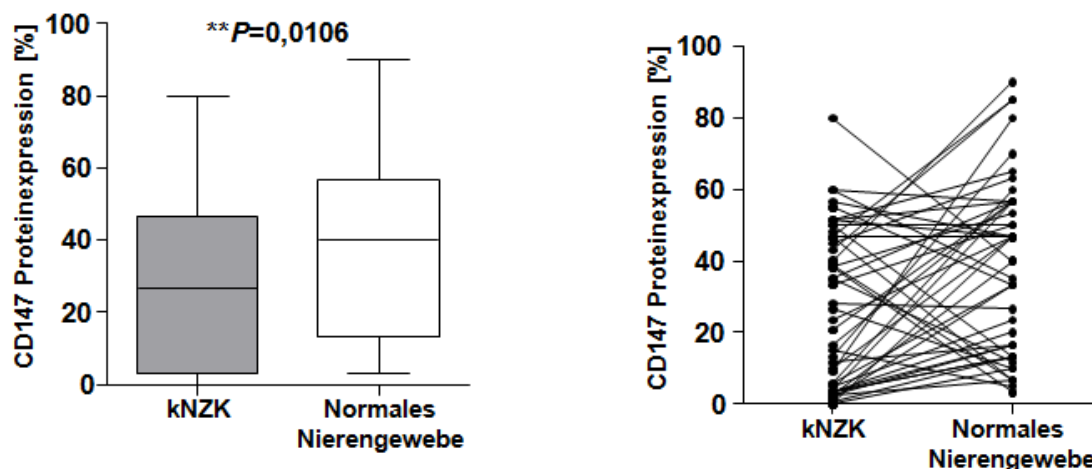


Abbildung 18: Evaluierung der Proteinexpression von CD147 im Nierentumor- und dazugehörigen tumorfreen Normalgewebe in der Kohorte 3

Das Ergebnis wurde aus dem semi-quantitativ berechneten Score abgeleitet.

Zudem Vergleich der zugehörigen Gewebepaare aus Tumor- und tumorfreen Normalgewebe.

Auf Proteinebene war die Expression im Gewebe des klarzelligen Nierenzellkarzinoms (Median: 26,67%; Bereich: 0-80%) signifikant niedriger als im dazugehörigen Normalgewebe (Median: 40%; Bereich: 3,33-90%).

Die Graphik wurde aus dem Paper (Fisel et al. 2015) [225] übernommen.

Für die betrachteten Kohorten 1 und 3 zusammengenommen war die Expression im tumorfreen Normalgewebe in 66 % der Fälle höher, verglichen mit dem dazugehörigen Nierentumorgewebe. In 34 % der Fälle war die Expression im Nierentumorgewebe höher.

Eine Assoziation der Proteinexpression von CD147 mit den klinisch-pathologischen Parametern, wie dem Tumorstadium und dem Auftreten einer Metastasierung, konnte in der Kohorte 3 nicht bestätigt werden (siehe Abbildung 19).

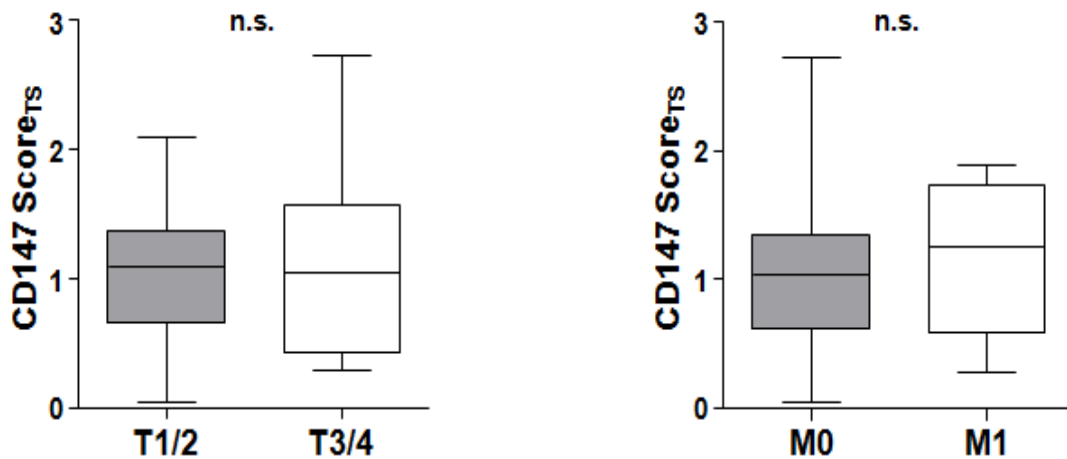


Abbildung 19: Assoziation der Proteinexpression von CD147 in der Kohorte 3 mit dem Tumorstadium bzw. mit dem Auftreten von Metastasen

Verwendet wurde der durch Tissue Studio erhobene Score_{TS}.

Es konnte keine signifikante Assoziation zwischen einer erhöhten Proteinexpression von CD147 und einem höheren Tumorstadium bzw. dem Auftreten von Metastasen gefunden werden.

Die Graphik wurde aus dem Paper (Fisel et al. 2015) [225] übernommen.

Ebenfalls zeigte die Überlebenszeitanalyse nach dem Kaplan-Meier-Verfahren keinen Zusammenhang zwischen der Expression von CD147 und dem tumorspezifischen Überleben der Patienten (CSS) (siehe Abbildung 20).

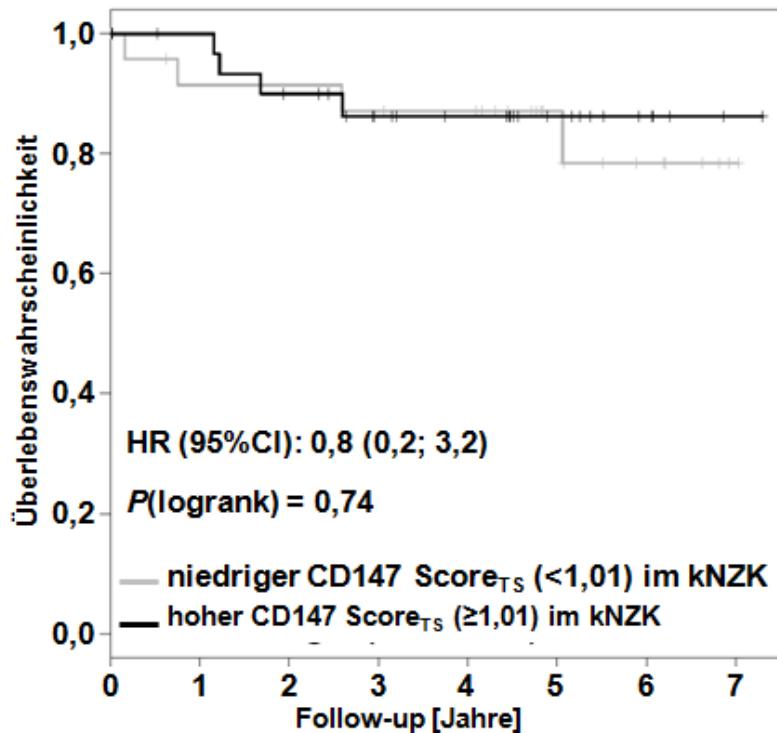


Abbildung 20: Überlebenszeitanalyse in der Kohorte 3

Überlebenszeitanalyse der Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom nach dem Kaplan-Meier-Verfahren basierend auf der Höhe der Proteinexpression von CD147 im Nierentumorgewebe der Kohorte 3.

Endpunkt war das tumorspezifische Überleben (CSS).

Grenzwerte wurden durch das Konzept der Conditional Inference Trees ermittelt.

Der Zusammenhang der Proteinexpression von CD147 mit dem tumorabhängigen Überleben konnte in der Kohorte 3 nicht bestätigt werden.

Die Graphik wurde aus dem Paper (Fisel et al. 2015) [225] übernommen.

3.3 Evaluation der mRNA-Expression von CD147

3.3.1 Expressionshöhe der mRNA von CD147 in der Kohorte 3

Für die Kohorte 3 war zusätzlich zu dem in Formalin-fixierten und in Paraffin-eingebetteten Gewebe, das für die Herstellung der TMAs zur Evaluierung der Proteinexpression von CD147 unter Anwendung der Software Tissue Studio verwendet wurde, gefrorenes Frischgewebe für die RNA-Analysen vorhanden.

Die Höhe der mRNA von CD147 wurde durch eine quantitative Echtzeit-PCR und TaqMan-Sonden untersucht und zur Höhe der mRNA von β -Aktin normalisiert. Diese Untersuchung wurde im IKP Stuttgart zusätzlich zur vorliegenden Arbeit durchgeführt. Die genaue Durchführung hierzu wird im Paper (Fisel et al. 2015) [225] beschrieben.

Auf der Ebene der mRNA lag die durchschnittliche Expression von CD147 in der Kohorte 3 im gefrorenen Frischgewebe des klarzelligen Nierenzellkarzinoms bei 2,54 (Bereich: 0,77 - 7,43) und im Normalgewebe bei 3,40 (Bereich: 1,28 - 18,19, siehe Abbildung 21). Auf der Ebene der mRNA wurde wie auf Proteinebene in 64 % der Fälle eine schwächere Expression von CD147 im Tumorgewebe verglichen mit dem tumorfreien Normalgewebe beobachtet, wohingegen in 36 % eine niedrigere Expression von CD147 im tumorfreien Gewebe vorlag.

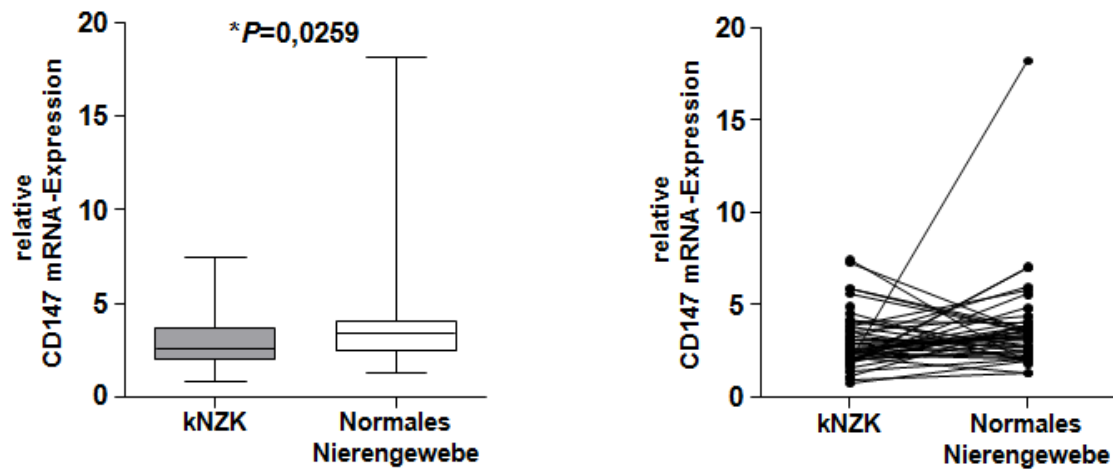


Abbildung 21: Relative Höhe der mRNA-Expression von CD147 in der Kohorte 3

Normalisierung zur mRNA von β -Aktin und Vergleich der Expressionsniveaus der mRNA von CD147 in den zusammengehörigen Proben aus Tumor- und tumorfreien Normalgewebe.

Bei den Patienten der Kohorte 3 unterschied sich das Expressionslevel auf mRNA-Ebene signifikant zwischen dem Gewebe des klarzelligen Nierenzellkarzinoms (Median: 2,54; Bereich: 0,77-7,43) und dem Normalgewebe (Median: 3,40; Bereich: 1,28-18,19).

Die Graphik wurde aus dem Paper (Fisel et al. 2015) [225] übernommen.

3.3.2 Expressionshöhe der mRNA von CD147 in der Kohorte 2

Die Höhe der mRNA von CD147 wurde in einer weiteren unabhängigen Kohorte (Kohorte 2) untersucht, um so eine zusätzliche Bewertung des prognostischen Potenzials von CD147 beim klarzelligen Nierenzellkarzinom vorzunehmen. In den RNA-Sequenzierungsdaten des The Cancer Genome Atlas (TCGA; n=530) zeigte sich ebenfalls, dass die mRNA-Expression von CD147 im Normalgewebe und im Nierentumorgewebe vergleichbar hoch war. Hierbei besaß das Nierentumorgewebe eine höhere Variabilität (siehe Abbildung 22).

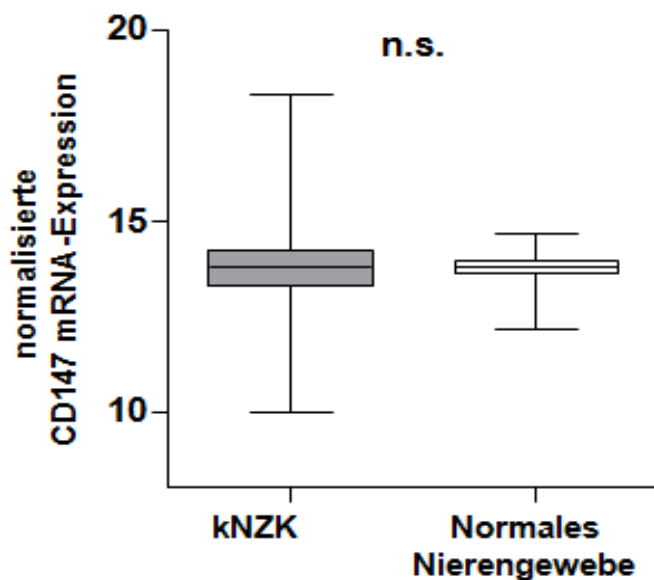


Abbildung 22: Höhe der normalisierten mRNA-Expression von CD147 in der Kohorte 2 (TCGA)

Vergleich von entsprechendem Tumor- ($n = 529$) und tumorfreien Normalgewebe ($n = 72$).

Die Graphik wurde aus dem Paper (Fisel et al. 2015) [225] übernommen.

Die Expressionshöhe auf mRNA-Ebene unterschieden sich nicht signifikant im Gewebe des klarzelligen Nierenzellkarzinoms (Median: 13,76; Bereich: 9,96-18,28) im Vergleich zur Expression im normalen tumorfreien Nierengewebe (Median: 13,8; Bereich: 12,17-14,66) in ccRCC-Patienten der Kohorte 2 (TCGA).

In der untersuchten Kohorte 2 war die Höhe der mRNA im Nierentumorgewebe allerdings auch nicht mit dem Patientenüberleben korrelierend (HR = 1,44, 95 % CI (0,94, 2,2); P(logrank)=0,088, siehe Abbildung 23).

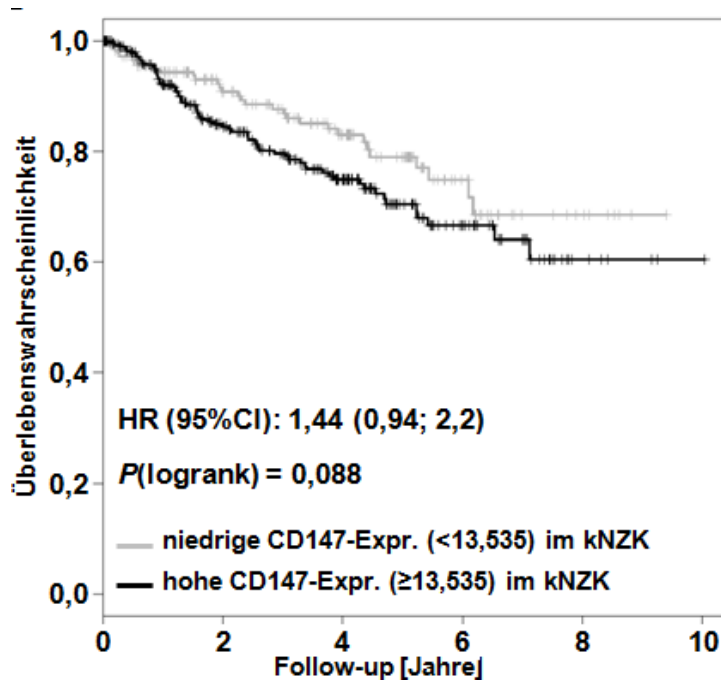


Abbildung 23: Überlebenszeitanalyse in der Kohorte 2

Tumorspezifische-Überlebenszeitanalyse nach dem Kaplan-Meier-Verfahren für Patienten mit hoher und niedriger mRNA-Expression von CD147.

Grenzwerte wurden durch das Konzept der Conditional Inference Trees ermittelt.

Die Höhe der Expression auf mRNA-Ebene war nicht mit dem Überleben der Patienten assoziiert.

Die Graphik wurde aus dem Paper (Fisel et al. 2015) [225] übernommen.

3.4 Resultate der Western-Blot-Analysen

Die Validierung des in den immunhistochemischen Färbungen verwendeten Antikörpers gegen CD147 erfolgte in einem siRNA-Knockdown in vier unterschiedlichen Zelllinien des Nierenzellkarzinoms. Hierbei konnte die Spezifität des verwendeten Antikörpers gegen CD147 nachgewiesen werden. Repräsentative Ergebnisse sind in der Abbildung 24 dargestellt.

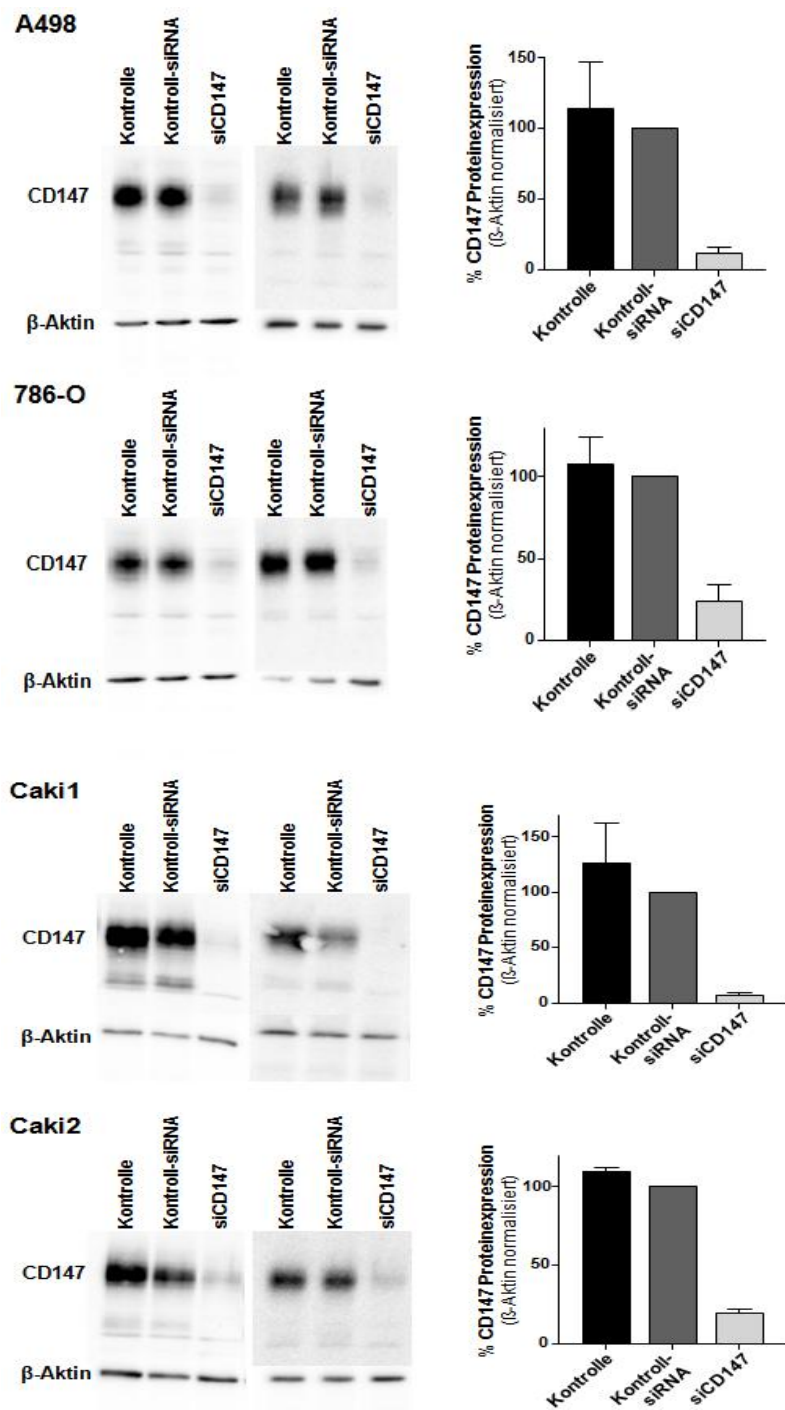


Abbildung 24: Repräsentative Western-Blots mit Färbungen für CD147

Validierung des Antikörpers gegen CD147 durch siRNA-vermittelten Knockdown von CD147 in 4 unterschiedlichen Zelllinien.

Dargestellt sind repräsentative Western-Blots von zwei unabhängigen Experimenten (links). Als Kontrollen wurden unbehandelte Zellen (Kontrolle) und Zellen, die mit einem siRNA-Pool behandelt wurden, welche nicht an das Zielgen binden (Kontroll-siRNA), verwendet. Die CD147 Proteinexpression wurde auf die Expression von β -Aktin normalisiert.

Die prozentuale Proteinexpression von CD147 wurde basierend auf 3 unabhängigen Experimenten berechnet und zur Expression von CD147 in den transfizierten Zellen mit non-targeting siRNA normalisiert.

Die Graphik wurde aus dem Paper (Fisel et al. 2015) [225] übernommen.

Die Western-Blot-Analysen wurden primär zur Validierung des in den immunhistochemischen Färbungen verwendeten Antikörpers gegen CD147 durchgeführt. In einem zweiten Teil wurde zusätzlich eine Inkubation der Membranen mit einem Antikörper, der sich gegen MCT4 richtete, vollzogen. Die Western-Blot-Analysen zeigten hier eine Abnahme des Expressionsniveaus von MCT4 in den transfizierten Zellen mit Knockdown von CD147 in allen 4 Zelllinien. Diese Beobachtung konnte für die Proben mit dem Pellet, das die membranösen Anteile der Zellen enthielt, sowie für die Proben mit dem Überstand, in dem bekanntlich die zytosolischen Anteile der Zellen enthalten waren, nachgewiesen werden. Die zu jeder Zelllinie gehörige Negativkontrolle mit non-targeting siRNA und die unbehandelte Zellkulturkontrolle zeigten einen klaren Nachweis von MCT4 im Pellet sowie für die Proben der Zelllinie A-498 auch für den Überstand. Die Proben mit dem Überstand der restlichen Zelllinien waren schwächer positiv für MCT4 (siehe Abbildung 25).

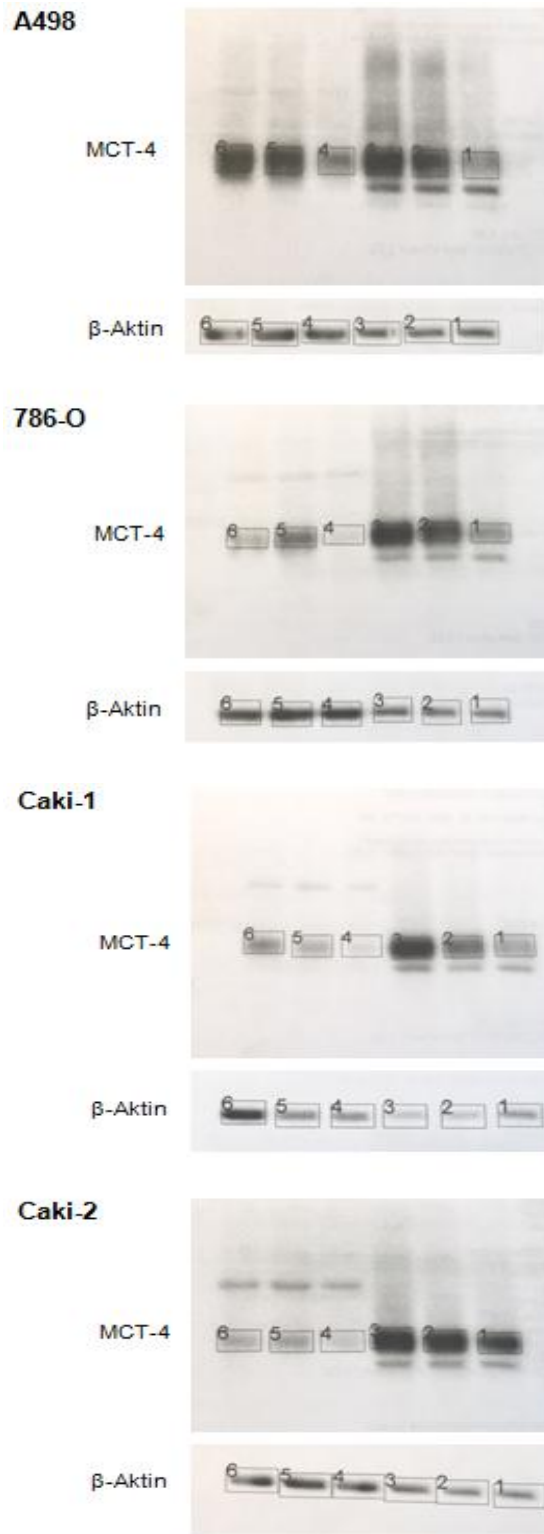


Abbildung 25: Repräsentative Western-Blots mit Färbungen für MCT4

- 1: siRNA-CD147, Pellet
- 2: Negativ-Kontrolle (non-targeting), Pellet
- 3: Unbehandelte Zellkulturkontrolle, Pellet
- 4: siRNA-CD147, Überstand
- 5: Negativ-Kontrolle (non-targeting), Überstand
- 6: Unbehandelte Zellkulturkontrolle, Überstand

3.5 Evaluation von prognostischen Modellen zur Vorhersage des Outcomes bei Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom

Die prognostische Vorhersagekraft der Expression von CD147 für das Outcome, d.h. das tumorspezifische Überleben der Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom wurde mittels Durchführung von univariaten Cox-Regressionsanalysen sowie der Berechnung des Harrells Konkordanz-Index (c-Index) bewertet. Die Ergebnisse wurden mit der kürzlich identifizierten Stärke in der Vorhersagefähigkeit der Expression von MCT4 und der DNA-Methylierung von 05_CpG_8.9 in der 5'-regulatorischen SLC16A3 Promotorregion verglichen [182].

Wie in Abbildung 17 gezeigt wurde, konnte die Proteinexpression von CD147 nur in der Kohorte 1 das Patientenüberleben signifikant vorhersagen (HR = 1,98, 95 % CI (1,29, 3,02); $P(\text{logrank}) = 0,0013$; Harrell's c-Index: 68,9 %). Dennoch war die prognostische Vorhersagekraft der Proteinexpression von MCT4 in der untersuchten Kohorte 1 geringfügig besser (HR = 1,03, 95 % CI (1,01, 1,04); $p(\text{logrank}) = 0,00004$; Harrell's c-Index: 71,9 %). Die Proteinexpression von MCT4 wurde in einer vorherigen Studie am IKP in Stuttgart an genau diesem Kollektiv untersucht und die Daten im September 2013 veröffentlicht [182]. Im Zuge dieser Veröffentlichung von *Fisel et al.* wurden ebenfalls die Daten des The Cancer Genome Atlas (TCGA) zur Expression von MCT4 auf der Ebene der mRNA analysiert. In der Kohorte 2 (TCGA) konnte nur die Höhe der mRNA von MCT4, aber nicht die von CD147, das Überleben signifikant vorhersagen (HR = 1,60, 95 % CI (1,21, 2,12); $P(\text{logrank}) = 0,0024$; Harrell's c-Index: 61,4 %). Die beste Vorhersage hatte hier die DNA-Methylierung der CpG-Stelle cg18345635 in der SLC16A3 Promotorregion (HR = 0,018, 95 % CI (0,003, 0,119); $P(\text{logrank}) = 0,00003$; Harrell's c-Index: 64,9 %).

Auch in der Kohorte 3 war die Proteinexpression von MCT4 im direkten Vergleich mit der von CD147 der bessere Prädiktor für das tumorspezifische Überleben (HR = 1,03, 95 % CI (1,0, 1,06); P(logrank) = 0,0636; Harrell's c-Index: 70,8 %). Ebenfalls zeigte sich in dieser Kohorte, dass die DNA-Methylierung an der CpG-Stelle 05_CpG_8.9, die kürzlich von *Fisel et al.* untersucht wurde, die beste Vorhersage für das tumorspezifische Überleben hatte (HR = 0,0068, 95 %CI (0,0002, 0,3022); P(logrank) = 0,0076; Harrell's c-Index: 80,0%).

Tabelle 22: Univariate Cox-Regressionsanalyse von potenziellen Prognosefaktoren für das tumorspezifische Überleben.

Die prognostische Stärke der einzelnen Faktoren wurde mit Hilfe der berechneten Harrell's C-Indices abgeschätzt.

Die Tabelle wurde aus dem Paper (Fisel et al. 2015) [225] übernommen und abgeändert.

		HR (95 % CI)	P-Wert (logrank)	Harrell's c-Index
Kohorte 1	Proteinexpression von CD147	1,98 (1,29-3,02)	0,0013	68,9 %
	Proteinexpression von MCT4 ^a	1,03 (1,01-1,04)	0,00004	71,9 %
Kohorte 2 (TCGA)	Höhe der mRNA von CD147	1,08 (0,83-1,40)	0,5540	52,2 %
	Höhe der mRNA von MCT4 ^a	1,60 (1,21-2,12)	0,0024	61,4 %
	DNA-Methylierung an der CpG-Stelle cg18345635 ^a	0,018 (0,003-0,119)	0,00003	64,9%
Kohorte 3	Proteinexpression von CD147	0,83 (0,23-2,96)	0,7780	53,7 %
	Proteinexpression von MCT4 ^a	1,03 (1,00-1,06)	0,0636	70,8 %
	DNA-Methylierung an der CpG-Stelle 05_CpG_8,9 ^a	0,0068 (0,0002-0,3022)	0,0076	80,0%

^a Daten wurden aus dem Paper (Fisel et al. 2015) [225] übernommen.

Zusätzlich wurde noch eine multivariate Cox-Regressionsanalyse, die beispielsweise das Tumorstadium oder den prognostischen SSIGN-Score beinhaltet, der auf den klinisch-pathologischen Parametern basiert, durchgeführt. Es zeigte sich, dass weder die Expression von CD147 noch die DNA-Methylierung von MCT4 unabhängige prognostische Faktoren waren. Nur die DNA-Methylierung von MCT4 an der CpG-Stelle 05_CpG_8.9 war signifikant mit den klinisch-pathologischen Parametern beim klarzelligen Nierenzellkarzinom assoziiert [182].

Tabelle 23: Multivariate Cox-Regressionsanalyse von potenziellen Prognosefaktoren für das tumorspezifische Überleben.

Diese bestehen aus der Proteinexpression von CD147 und MCT4 (Kohorte 1), der mRNA-Expression von CD147 und MCT4 und der DNA-Methylierung (Kohorte 2), der Proteinexpression von CD147 und MCT4 und der DNA-Methylierung (Kohorte 3). Die Tabelle wurde aus dem Paper (Fisel et al. 2015) [225] übernommen und abgeändert.

		HR (95 % CI)
Kohorte 1	Proteinexpression von CD147	1,32 (0,81-2,13)
	Proteinexpression von MCT4 ^a	1,02 (1,01-1,04)
Kohorte 2 (TCGA)	Höhe der mRNA von CD147	0,98 (0,63-1,53)
	Höhe der mRNA von MCT4 ^a	1,27 (0,86-1,87)
	DNA-Methylierung an der CpG-Stelle cg18345635 ^a	0,03 (0,004-0,22)
Kohorte 3	Proteinexpression von CD147	0,21 (0,03-1,25)
	Proteinexpression von MCT4 ^a	1,03 (0,97-1,09)
	DNA-Methylierung an der CpG-Stelle 05_CpG_8.9 ^a	0,004 (0,0000-0,76)

^aDaten wurden aus dem Paper (Fisel et al. 2015) [225] übernommen.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Expression von CD147, dessen Anwendbarkeit als Zielstruktur für therapeutische Interventionen sowie als potenzieller Prädiktor für das Outcome von Patienten mit einem klarzelligem Nierenzellkarzinom untersucht. CD147 stellt das zwingend erforderliche Nebenprotein für den korrekten Einbau der Monocarboxylattransporter MCT1 und MCT4 in die Plasmamembran dar. Die prognostische Vorhersagekraft des Proteins MCT4 sowie der DNA-Methylierung im *SCL16A3* Promoter wurden in vorherigen Untersuchungen für das klarzellige Nierenzellkarzinom entdeckt [182]. Daten zur prognostischen Vorhersagekraft von CD147 und dessen epigenetischer Regulation sind allerdings bis jetzt begrenzt [156, 207].

Für die vorliegende Arbeit wurden TMAs aus dem in Paraffin-eingebetteten Gewebe konstruiert, um auf diese Weise eine Standardisierung im immunhistochemischen Färbeprozess zu erreichen. Die Herausforderung der TMA-Technik besteht darin, dass pro Patient nur ein kleiner Gewebeausschnitt repräsentativ für das ganze Tumorgewebe verwendet wird. Ein Ausgleich dieses vermeintlichen Defizits kann durch gewissenhafte Auswahl der entsprechenden Bereiche sowie der Verwendung von beispielsweise mindestens zwei Tumorstanzen aus unterschiedlichen Gewebebereichen pro Patient erreicht werden. Trotz vorheriger histologischer Bewertung können der Tumorgehalt und die Gewebheterogenität jedoch abhängig von der Schnitthöhe des TMAs variieren. Insofern ist die Qualität der Gewebe-Cores von größter Wichtigkeit.

Herkömmlicherweise wird die manuelle Auswertung, d.h. die Auswertung durch den Menschen, als optimale Methode zur Quantifizierung der immunhistochemischen Färbung angesehen. Dabei findet eine Bewertung der Färbeintensität und des prozentualen Anteils an gefärbten Zellen statt. Diese Form der Analyse liefert Ergebnisse auf einer nominalen Skala. Die Bewertung der Färbeintensität geschieht generell auf einer vergleichenden Weise und hierbei erfolgt die Quantifizierung in weite Kategorien, anstatt der Färbeintensität einen exakten Zahlenwert zuzuordnen [224].

Die vorliegende Arbeit hat für die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen neben der manuellen Auswertung eine zusätzliche Auswertung mit Hilfe eines computergestützten automatisierten Analyseprogrammes gewählt. Diese Art der Auswertung von immunhistochemischen Färbungen bietet viele Vorteile. Anzuführen ist hier, dass auf diese Weise ein objektives Ergebnis auf einer kontinuierlichen Skala anstatt auf einer nominalen Skala entsteht. Insbesondere ist die durch die Software entstandene Reproduzierbarkeit in der Auswertung der Färbungen hervorzuheben [219]. Automatisierte Auswertungsprogramme können zudem besser zwischen feinen Unterschieden in der Färbeintensität, vor allem bei hohen und niedrigen Färbeextremen, differenzieren. Weiter ist diese Art der Auswertung 30- bis 50fach schneller als das Pathologen-basierte Scoringsystem. In Folge der Automatisierung der Auswertung könnte eine schnelle Analyse von großen Kohorten mit Hilfe von TMAs ermöglicht werden und auf diese Weise eine Erleichterung in der Schaffung von Assoziationen zwischen Biomarkern und klinisch-pathologischen Eigenschaften hergestellt werden. [223]. Durch Verwendung von TMAs und Färbeautomaten in Verbindung mit einer Software-basierten Bildanalyse könnte zudem die Qualität von aus der Immunhistochemie gewonnenen Daten generell verbessert werden [224].

Im Jahr 2008 fassten *Conway et al.* in einer Veröffentlichung die Fakten zur Software-basierten Bildanalyse zusammen und führten hier auch Publikationen auf, die überwiegend eine hohe Korrelation der automatisierten zur manuellen Auswertung nachweisen konnten [224]. Jedoch wurden hierfür andere Softwarehersteller verwendet und bei den untersuchten Geweben handelte es sich nicht um Nierengewebe.

Um eine genaue und reproduzierbare Quantifizierung der Proteinexpression von CD147 im Nierenzellkarzinomgewebe der beiden untersuchten Kohorten in den immunhistochemischen Färbungen der TMAs zu gewährleisten, wurde im ersten Schritt die Leistung der in dieser Arbeit verwendeten Software Tissue Studio v.3.6 (Definiens AG) bewertet.

Im Vergleich des manuell berechneten semi-quantitativen Scores mit den Ergebnissen der Software-unterstützten Quantifizierung der Immunreaktivität und dessen berechneten Scores (Score_{TS}) zeigte sich eine starke Korrelation. Festzuhalten ist, dass Tissue Studio v.3.6 eine praktikable Arbeitshilfe zur Quantifizierung der membranösen Expression des Biomarkers CD147 im Gewebe des klarzelligen Nierenzellkarzinoms darstellt.

Wie aus der Abbildung 14 ersichtlich wird, fielen bei der Korrelation der manuellen und Software-basierten Auswertung einzelne Ausreißer mit einer niedrigen Korrelation auf. Eingehende Betrachtungen der Ausreißer zeigten, dass die betreffenden Cores zum Großteil weniger als 5 % Tumorzellen enthielten bzw. aus heterogenem Tumorgewebe bestanden. Diese Heterogenität des untersuchten Gewebes ist eine besonders zu nennende Schwierigkeit der automatisierten Auswertung. Denn meistens handelt es sich bei Tumorgewebe um ein komplexes Gemisch aus sich überlagernden Tumorzellen, benignen Wirtszellen sowie Extrazellulärmatrix [223]. Aufgrund dieser oft hohen Komplexität der Gewebe wird bis heute der Großteil aller immunhistochemischen Färbungen an TMAs noch mit Hilfe des menschlichen Auges manuell ausgewertet [223, 224]. Allerdings belegen Studien, dass selbst für eher heterogene Tumorarten, wie beispielsweise das Hodgkin-Lymphom und das Prostatakarzinom, das Verfahren der Software-basierten Auswertung geeignet ist [218].

Eine Einschränkung der automatisierten Software-basierten Auswertung bleibt. Es kann heikel sein, nur anhand der zu Beginn durchgeführten Trainingseinheit mit Hilfe einer beschränkten Anzahl von Trainingsbildern alle in den Geweben vorkommenden Zelltypen, wie beispielsweise Tumorzellen und Zellen des Tumorstromas, auseinanderzuhalten. Außerdem ist noch immer eine manuelle Intervention im Sinne eines Trainings der Software durch z.B. Festlegen der verschiedenen zu unterscheidenden Zelltypen sowie Anpassung von Schwellenwerten oder anderen Bildeigenschaften (Sättigung, Kontrast, etc.), nötig.

Auch wenn hier eine gute Korrelation der manuellen und Software-basierten semi-quantitativen Auswertung der membranösen Färbung von CD147

gefunden wurde, fehlen mit Sicherheit noch weitere Studien mit zusätzlichen Biomarkern, um auf diesem Wege die Zuverlässigkeit dieser Software-basierten Auswertung für das klarzellige Nierenzellkarzinom zu belegen.

Die Evaluierung der Proteinexpression von CD147 wurde in dieser Arbeit an den beiden unabhängigen Kohorten (Kohorte 1 und 3) durchgeführt und zeigte für das Tumor- sowie das korrespondierende Normalgewebe eine erhebliche interindividuelle Variabilität in der Expression. Die Expression im normalen tumorfreien Nierengewebe wurde nur manuell, nicht Software-basiert, ausgewertet. Beide Kohorten zusammen betrachtet, war die Expression von CD147 in 66 % der Fälle sogar im tumorfreien Normalgewebe höher, verglichen mit dem dazugehörigen Nierentumorgewebe. In 34 % der Fälle war die Expression im Nierentumorgewebe höher. Hierbei war CD147 an der Zellmembran der epithelialen Zellen des proximalen und distalen Tubulus exprimiert. Dies deckt sich mit Studienergebnissen von *Kim et al.*, die ebenfalls eine dortige Anfärbung von CD147 im tumorfreien Nierengewebe beschrieben hatten [207]. Ein Widerspruch besteht allerdings zu früheren Studienergebnissen, die keine [74, 231] bzw. eine niedrige Expression von CD147 [175] im normalen Tubulusepithel der Nieren feststellten.

Zu bedenken ist, dass *Jin et al.* [175] und *Tsai et al.* [231] in ihrer Untersuchung einen anderen Antikörper gegen CD147 für ihre Färbungen verwendet haben. *Kim et al.* [207] verwendete, wie in der hier durchgeführten Untersuchung, den Antikörper der Firma Abcam und zeigte übereinstimmend mit den hier ermittelten Ergebnissen eine Expression von CD147 im tumorfreien Nierengewebe. Zudem wurde der für die immunhistochemischen Färbungen verwendete Antikörper gegen CD147 durch den hier durchgeführten Knockdown von CD147 in 4 verschiedenen Zelllinien und sich daran anschließende Western-Blot-Untersuchungen validiert. Auf diese Weise wurde die Spezifität des verwendeten Antikörpers nachgewiesen. Festzuhalten ist außerdem, dass die Kontrollgruppe mit nur 8 bei *Jin et al.* (Jin 2006) bzw. 12 bei *Liang et al.* (Liang 2009) untersuchten Gewebeproben des tumorfreien Nierengewebes sehr klein war. Die hier durchgeführte Untersuchung umfasste

eine deutlich größere Studienpopulation, darunter eine Anzahl von 245 Gewebeprobe mit normalem Nierentubulusgewebe.

In der untersuchten Kohorte 2, den RNA-Sequenzierungsdaten des The Cancer Genome Atlas (TCGA; n=530), konnte bestätigt werden, dass die Expressionshöhe der mRNA von CD147 im Normalgewebe und Nierentumorgewebe vergleichbar hoch waren. Allerdings zeigte sich im Nierentumorgewebe eine höhere Variabilität.

In der hier untersuchten Kohorte 1 war ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Proteinexpression von CD147 und einem höheren Tumorstadium sowie dem Auftreten von Metastasen aufzeigbar. Diese Assoziation der Proteinexpression mit klinisch-pathologischen Eigenschaften konnte in der Kohorte 3 jedoch nicht nachgewiesen werden. Bei gleichem verwendeten Antikörper gegen CD147 kann hier nur die interindividuelle Expression von CD147 als Erklärung angeführt werden, die bei einem kleineren Patientenkollektiv wie der Kohorte 3 womöglich mehr ins Gewicht fällt.

Für den Biomarker MCT4 konnte hingegen eine Assoziation zwischen der Expressionshöhe mit den klinisch-pathologischen Eigenschaften in beiden Kohorten nachgewiesen werden. Dabei wurde das Gewebe der Kohorte 1 und 3 bereits im Rahmen einer früheren Untersuchung am IKP in Stuttgart für MCT4 immunhistochemisch gefärbt und die daraus gewonnen Daten von *Fisel et al.* [182] veröffentlicht.

Eine signifikante Assoziation des Expressionsniveaus von CD147 mit den klinisch-pathologischen Eigenschaften konnte in vergangenen immunhistochemischen Untersuchungen an Gewebe des klarzelligem Nierenzellkarzinoms von verschiedenen Studiengruppen belegt werden [74, 175, 207, 231]. So korrelierte beispielsweise bei *Kim et al.* eine Überexprimierung von CD147 mit einem hohen nukleären Grading nach Fuhrman, dem Vorhandensein von nekrotischen Tumorarealen und einem großen Tumordurchmesser. Im Gegensatz hierzu konnten *Kim et al.* keinen Zusammenhang zwischen der Expression von MCT4 und den klinisch-pathologischen Eigenschaften nachweisen. Außerdem waren bei *Kim et al.* die

Tumoren verhältnismäßig stärker für CD147 (79,4 % der Tumoren positiv für CD147) verglichen zu MCT4 (39,4 % der Tumoren positiv für MCT4) gefärbt. Zudem war die membranöse Färbintensität variabel und heterogen von Fall zu Fall [207]. Mögliche Gründe werden im Verlauf diskutiert.

Das Nierenzellkarzinom ist eines der aggressivsten Tumoren und die momentan verwendeten Prognosesysteme sind zu ungenau in der Vorhersage. In einer Reihe von klinischen Berichten wurde aufgezeigt, dass das biologische Verhalten und die Prognose von Patienten mit einem Nierenzellkarzinom sehr unterschiedlich sein kann, selbst bei Vorliegen desselben Tumorstadiums und desselben histologischen Typs bzw. Differenzierungsgrads [74]. So konnte bei einigen Patienten, die sich bei bereits fortgeschrittenem Tumorstadium einer kurativen Operation unterzogen, ein Langzeitüberleben beobachtet werden. In anderen Fällen entwickelten Patienten, trotz zum Operationszeitpunkt vorliegendem niedrigem Tumorstadium, Metastasen und verstarben. Dies zeigt, wie wichtig die Suche nach neuen Biomarkern als Indikatoren für das maligne Potenzial des Nierenzellkarzinoms ist, um mit Hilfe dieser die Prognose der Patienten mit einem klarzelligem Nierenzellkarzinom präziser vorhersagen zu können.

In Bezug auf die prognostische Fähigkeit von CD147 legten die in dieser Arbeit durchgeführten univariaten Cox-Regressionsanalysen offen, dass die Expression von CD147 nicht mit dem tumorspezifischen Überleben in allen hier untersuchten Kohorten assoziiert war. Nur in der Kohorte 1 wurde eine signifikante Assoziation der Proteinexpression von CD147 mit dem Outcome der Patienten gefunden. In der Kohorte 3 war diese Assoziation nicht nachweisbar. Die Höhe der mRNA von CD147 war weder in der Kohorte 2 (TCGA) noch in der Kohorte 3 mit dem tumorspezifischen Überleben assoziiert. Dabei zeigte sich die vorher auf Proteinebene beobachtete Variabilität nun auch in der Expression von CD147 auf der Ebene der mRNA von CD147 im Tumorgewebe der TCGA-Kohorte sowie in der hier untersuchten Kohorte 3. Im Vergleich zeigte die Proteinexpression von MCT4 und speziell die Methylierung

des SLC16A3 Promoters eine hohe prognostische Bedeutsamkeit, unabhängig von der untersuchten Kohorte.

Wie schon erwähnt, untersuchte eine im Jahr 2015 von *Kim et al.* veröffentlichte Studie, basierend auf immunhistochemischen Färbungen an TMAs, die Expression von CD147, MCT1 und MCT4 beim klarzelligem Nierenzellkarzinom. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass eine hohe Expression von MCT1, MCT4 oder CD147 auf Proteinebene mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben einherging. Zusätzlich erfolgte auch bei *Kim et al.* die Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten der TCGA-Kohorte. Sie belegten, dass hier ein hohes Expressionsniveau von CD147 auf mRNA-Ebene mit einem schlechteren Gesamtüberleben einherging und somit eine Vorhersagefähigkeit für die Progression der Erkrankung hatte. Zudem war die Expression von CD147 stark zur Expression von MCT4 korreliert. Desweiteren zeigten die Analysen der TCGA-Daten, dass die Expression von MCT4 eine Tendenz zum gemeinsamen Auftreten mit CD147 und HIF-1 α zeigt [207]. Für MCT4 konnten *Kim et al.* diese Beziehung zur Prognosevorhersage in den TCGA-Daten jedoch nicht nachweisen. Auch *Sato et al.* wiesen nach, dass die Expression von CD147 bei Patienten mit einem Nierenzellkarzinom mit den klinisch-pathologischen Eigenschaften, der Höhe des Angiogeneseprofils und ebenso der Prognose assoziiert war [156].

Folgende Gründe versuchen die von *Kim et al.* abweichenden Beobachtungen im Tumor- und tumorfreien normalen Nierengewebe zu erklären. In den vorherig durchgeführten Färbungen für MCT4 an den Kohorten 1 und 3 von *Fisel et al.* am IKP Stuttgart wurde ein anderer primärer Antikörper gegen MCT4 verwendet [182]. Erwähnenswert ist zudem, dass unterschiedliche Endpunkte für die Analyse des Outcomes ausgewählt wurden. Basierend auf den RNA-Sequenzierungsdaten der TCGA-Kohorte konnten *Kim et al.* keine Assoziation der Expression von MCT4 mit dem Gesamtüberleben finden. In der hier durchgeführten Untersuchung wurde das tumorspezifische Überleben so definiert, wie *Gulati et al.* es kürzlich für das klarzellige Nierenzellkarzinom vorgeschlagen haben [230]. So wurde immer der längste Follow-up-Zeitraum aus allen Datenquellen verwendet. Im Falle eines Widerspruchs wurde das

tumorspezifische Überleben (CSS) auf NA (nicht vorhanden) gesetzt. Außerdem gilt zu bedenken, dass für diese Arbeit ein späterer Follow-up-Zeitpunkt der TCGA-Kohorte verwendet wurde, da die Daten erst im Mai 2015 von der Datenbank bezogen wurden. Es ist auch von Interesse, dass bei den hier untersuchten Daten die Analyse auf Grenzwerten basierte, die durch das Konzept der Conditional Inference Trees ermittelt wurden und im Gegensatz zu den Ergebnisse von *Kim et al.* eine signifikante Assoziation der mRNA Expression von MCT4 und dem Gesamtüberleben der Patienten der TCGA-Kohorte nachweisen konnten. Diese war allerdings schwächer als die Assoziation mit dem tumorspezifischen Überleben.

Die von *Kim et al.* gemachten Beobachtungen decken sich jedoch mit den Ergebnissen aus immunhistochemischen Färbungen von MCT1, MCT4 und CD147 an einem Kollektiv mit 360 Patienten mit einem Urothelkarzinom der Harnblase. Hier wurde sichtbar, dass nur eine hohe Expression von MCT1 und CD147 mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium assoziiert war, während eine hohe Expression von MCT4 keine Assoziation zeigte [149]. In Überlebensanalysen konnte dies bestätigt werden. So waren hohe Expressionsraten von MCT1 und CD147 Prädiktoren für ein schlechtes Gesamtüberleben. Allerdings war hier eine hohe Expression von MCT4 mit einem reduziertem Rezidiv-freien Überleben assoziiert, vor allem bei Patienten mit einem Urothelkarzinom der Harnblase im Stadium Ta und T1. Somit könnten laut dieser Studie erhöhte Expressionsraten von MCT1 und MCT4 als unabhängige Prognosefaktoren für ein schlechtes Gesamt- und Rezidiv-freies Überleben, v.a. bei Patienten mit einem Urothelkarzinom im Tumorstadium Ta und T1, gewertet werden [149]. In dieser Studie zeigten sich jedoch in einer erheblichen Anzahl von Fällen widersprüchliche Expressionsprofile von CD147 und MCT1 bzw. MCT4. Dies lässt vermuten, dass sich CD147 und MCT1 bzw. MCT4 nicht ausschließlich gegenseitig regulieren, sondern auch unabhängig voneinander während der Tumorprogression beim Urothelkarzinom wirken könnten. Für diese Hypothese braucht es aber noch weiterführende Forschungen [149]. Die Hypothese des Vorhandenseins von zusätzlich

beteiligten Interaktionsmolekülen zwischen den MCTs und CD147 kann auch für das klarzellige Nierenzellkarzinom aufgestellt werden.

Anhand von zwei weiteren Tumorentitäten soll aufgezeigt werden, dass CD147 durchaus großes prognostisches Potenzial besitzt. Multivariate Analysen enthüllten, dass die Expression von CD147 ein unabhängiger Prognosefaktor bei Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom ist [204]. So ist die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom und niedriger Expression von CD147 höher als in den Fällen mit hoher Expression [203]. *Yang et al.* stellten fest, dass eine hohe Expression von CD147 mit einem schlechten Gesamtüberleben bei Patienten mit einem Glioblastom assoziiert war [203].

Die evidente Verbindung der Variable CD147 mit MCT1 bzw. MCT4 gilt als erwiesen, seit nachgewiesen wurde, dass CD147 für eine korrekte Lokalisation der Monocarboxylattransporter MCT1 und MCT4 an der Zellmembran unabdingbar ist. So zeigten transfizierte Zellen, bei denen CD147 ausgeknockt wurde, eine Akkumulation von MCT1 und MCT4 im perinukleären Kompartiment und eine begleitende Abnahme der Expression an der Zellmembran [148]. Dieses Phänomen konnte nebenbefundlich in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Western-Blot-Analysen demonstriert werden. Im Zuge dieser Analysen wurden die Nitrozellulosemembranen zusätzlich mit einem Antikörper gegen MCT4 gefärbt. In den transfizierten Zelllinien, in denen CD147 ausgeknockt war, konnte hierbei eine signifikante Abnahme des Expressionsniveaus von MCT4 in allen 4 Zelllinien beobachtet werden. Die Abnahme war in den membranösen Anteilen der Zellen, d.h. in der Pellet-Fraktion sowie ebenso in den zytosolischen Anteilen, die sich in der Überstand-Fraktion befanden, sichtbar. In der zu jeder Zelllinie gehörigen Negativkontrolle (non-targeting) und Zellkulturkontrolle konnte MCT4 in der Pellet-Fraktion klar nachgewiesen werden. Nur in der Zelllinie A-498 zeigte sich MCT4 auch in der Überstand-Fraktion deutlich nachweisbar, wohingegen sich die restlichen Proben mit den Überständen der anderen Zelllinien schwächer positiv für MCT4 zeigten. Einschränkend muss angebracht werden, dass dieses Ergebnis nur explorativ mit einer potentiellen Tendenz zu werten ist und dieses

Experiment noch mehrfach wiederholt werden müsste, um eine valide Aussage zu ermöglichen. Des Weiteren wäre im nächsten Schritt erstrebenswert die Zytosolfraktion genauer zu untersuchen, um die Färbung von MCT4 zu erklären z.B. durch Aufdeckung der Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum versus Golgi.

Im Jahr 2012 machten *Ke et al.* schon die gleichen Beobachtungen an einer Zelllinie des humanen Adenokarzinoms der Lunge, in der sie ebenfalls CD147 ausknockten. In anschließenden Western-Blot-Analysen wurde die Abnahme von MCT4 und dem zusätzlich untersuchten MCT1 ersichtlich [179].

In den letzten Jahren wurde für die Proteine MCT1 und MCT4 eine Schlüsselrolle im Tumormetabolismus nachgewiesen. Eine erhöhte Glykolyserate, auch in der Anwesenheit von Sauerstoff, wurde kürzlich als grundlegendes Merkmal von malignen Zellen aufgedeckt [150] und ist auch unter den Namen "Warburger Effekt" oder "aerobe Glykolyse" bekannt [176, 178]. In diesem Zusammenhang ermöglichen MCT1 und MCT4 den Tumorzellen ihren hohen glykolytischen Status beizubehalten, indem sie den Export von Laktat und Protonen in die Extrazellulärmatrix gewährleisten und dadurch den durch die intrazelluläre Azidose drohenden Zelltod abwenden [149]. Über eine Überexprimierung von MCT1 und MCT4 wurde bei einer Vielzahl von soliden Tumoren berichtet [149]. Da das klarzellige Nierenzellkarzinom zu den glykolytischen Tumoren gezählt wird, könnte eine zielgerichtete Inhibierung der Monocarboxylattransporter MCT1 und MCT4 und deren Chaperon CD147 entweder alleine oder in Kombination, einen Beitrag dazu leisten, die Progression dieser Erkrankung aufzuhalten.

Aktuell wird der oral-verabreichte MCT1-Inhibitor AZD3965 in einer klinischen Phase I/II-Studie für die Behandlung von fortgeschrittenen soliden Tumoren getestet [149]. Weiter werden MCT4-spezifische Inhibitoren von Astra Zeneca mit der Erwartung das Tumorwachstum zu hemmen, momentan entwickelt [232]. Alternativ könnte die abweichende DNA-Methylierung am SLC16A3 Promoter für therapeutische Interventionen ausgenutzt werden.

Im Folgenden wird die Verwendung von CD147 als mögliches therapeutisches Target kritisch beleuchtet. CD147 wird weitreichend in menschlichen Tumoren exprimiert und spielt eine Schlüsselrolle bei der Förderung von Tumorinvasion, -progression und Metastasierung durch u.a. Hochregulierung der MMPs in den umliegenden Fibroblasten [132, 160]. Da CD147 zudem regulierenden Einfluss auf die Angiogenese, durch beispielsweise dortige Regulation der VEGF-Produktion hat [152] und eine Überexpression von CD147 stark im Zusammenhang mit Prozessen wie der Tumorinvasion, multiplen Drug Resistance sowie einer schlechten Prognose in menschlichen Tumoren steht, könnte CD147 als Target durchaus interessant sein [137].

Sato et al. konnten in Mausmodellen, bei denen den Mäusen ein klarzelliges Nierenzellkarzinom implantiert wurde, nachweisen, dass eine Überexpression von CD147 das Tumorwachstum beschleunigte, die Angiogenese verstärkte und zur Resistenz gegenüber Sunitinib führte [156]. Weiter konnten *Sato et al.* zeigen, dass die Downregulation von CD147 durch siRNA in Zelllinien des Nierenzellkarzinoms zur Abnahme von löslichem VEGF führte und signifikant die Proliferation und Invasion der Zellen des Nierenzellkarzinoms hemmte [156]. Des Weiteren führt die Hemmung von CD147 mittels Antikörper (MEM-M6/1) in CD147-exprimierenden Tumorzelllinien zu einer Inhibierung des Laktattransports, was in einer intrazellulären Azidose und dem daraus folgenden Zelltod endete [149]. Eine Behandlung von Zelllinien des Ovarialkarzinoms mit siRNA-Interferenz führte über die Downregulation von CD147 zu einer Reduktion der Expression von VEGF und MMP-9 und darüber zu einer Verminderung des Wachstums und der Invasivität sowie der Induktion der Apoptose [162].

Tatsächlich wurde in der Behandlung des hepatozellulären Karzinoms durch monoklonale Antikörper gegen CD147 ein klinischer Fortschritt erreicht. Verglichen mit der mit ^{131}I behandelten Kontrollgruppe, wurde durch die Anwendung eines ^{131}I -markierten monoklonalen Antikörpers gegen CD147 eine Senkung der Metastasierung des hepatozellulären Karzinoms in Kaninchenmodellen beobachtet [233]. *Niu et al.* wiesen darauf hin, dass der gegen CD147 gerichtete Antikörper als vielversprechendes Medikament für die

Behandlung des hepatozellulären Karzinoms durch Hemmung der Metastasierung und des Wachstums, Senkung der Expression von MMP-2 sowie der Induktion einer Tumornekrose dienen könnte [233]. In einer ersten klinischen Phase I/II-Studie wurde ein gegen CD147 gerichteter Antikörper bei Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom angewendet. Hierdurch konnte eine Größenabnahme der Metastasen bei 27 % der Patienten erreicht und eine weitere Tumorprogression bei 58 % der Patienten verhindert werden [201].

Obgleich CD147 eine zentrale Rolle in der Karzinogenese spielen könnte und deutlich im Gewebe des klarzelligen Nierenzellkarzinoms exprimiert ist, ist die wesentliche Einschränkung für den Gebrauch von CD147 als therapeutisches Target, dass CD147 in dieser Untersuchung auch deutlich im tumorfreien normalen Nierengewebe exprimiert war und dort viele lebenswichtige physiologische Funktionen erfüllt. Therapeutische Interventionen würden somit ebenfalls dem gesunden Nierengewebe schaden.

Zur Tumorkontrolle bedarf es demnach eine selektive Blockade der CD147-abhängigen Funktionen, wie der Induktion der MMPs, Hyaluronsäure oder VEGF sowie der Funktion von CD147 als Chaperon für MCT4, ohne ein Eingreifen in andere wichtige physiologische Funktionen [137]. Auch benötigt die Frage nach Nebeneffekten durch Antikörper gegen CD147 im menschlichen Körper weitere Untersuchungen.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass der Beitrag der Proteinexpression von CD147 zur Vorhersage des tumorspezifischen Überlebens beim klarzelligen Nierenzellkarzinom limitiert ist. Dies wird klar durch die prognostische Stärke der Expression von MCT4 und hier speziell durch die DNA-Methylierung an spezifischen CpG-Sites in der SLC16A3 Promoterregion übertroffen. Da zudem die Expression von MCT4, verglichen mit der von CD147, in der hier durchgeführten Untersuchung signifikant höher im Gewebe des klarzelligen Nierenzellkarzinoms verglichen mit dem tumorfreien Normalgewebe exprimiert war, ist MCT4 womöglich ein besserer Kandidat für die "Target-Therapie". Die hier gemachten Beobachtungen

bekräftigen demnach die Rolle von MCT4 als ein qualifizierter prognostischer Biomarker für das klarzellige Nierenzellkarzinom.

Obwohl in dieser Arbeit die Stärke des Proteins CD147 als prognostischer Marker und therapeutischer Angriffspunkt in den hier untersuchten Gewebeproben des klarzelligen Nierenzellkarzinoms nicht einheitlich bestätigt werden konnten, geht in nächster Zeit die Forschung an CD147 weiter, um evtl. durch zielgerichtete Inhibierung eine neue wichtige Therapieoption bei verschiedenen Tumorarten zu erhalten. Im Ausblick könnte auch die Entwicklung von Therapeutika, die nur spezifische Domänen des Moleküls CD147 hemmen und darüber womöglich eine Inhibierung von selektiven Funktionen von CD147 erreicht werden könnte, angestrebt werden. Auf diese Weise würden die wichtigen physiologischen Funktionen des Proteins CD147 nicht negativ beeinflusst werden, sondern eine selektive Inhibierung der tumorigenen Prozesse mit Beteiligung von CD147 erreicht werden [160].

Abgesehen von der Beteiligung von CD147 in den Prozessen der Tumorgenese könnte durch die selektive Hemmung von CD147 beispielsweise ebenfalls Einfluss auf Erkrankungen genommen werden, bei denen eine Beteiligung von CD147 nachgewiesen wurde, wie u.a. bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen [112-115], kardiale Erkrankungen, die mit arteriosklerotischen Plaques assoziiert sind wie beispielsweise die Herzinsuffizienz [99-101], Malaria [109, 110] sowie der Multiplen Sklerose [107, 108].

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von CD147 beim klarzelligem Nierenzellkarzinom untersucht. CD147 wird weitreichend in menschlichen Tumoren exprimiert und spielt eine Schlüsselrolle bei der Förderung von Tumorinvasion, -progression und Metastasierung durch u.a. Hochregulierung der MMPs in den umliegenden Fibroblasten. Außerdem ist CD147 essentiell für den korrekten Einbau der Monocarboxylattransporter MCT1 und MCT4 in die Zellmembran. MCT1 und MCT4 ermöglichen den Tumorzellen ihren hohen glykolytischen Status, der ein grundlegendes Merkmal vieler maligner Zellen ist, beizubehalten, indem sie den Export von Laktat und Protonen in die Extrazellulärmatrix gewährleisten und so den durch intrazelluläre Azidose drohenden Zelltod abwenden. Das klarzellige Nierenzellkarzinom wird zu den glykolytischen Tumoren gezählt. Für zahlreiche Tumorentitäten konnte nachgewiesen werden, dass die Höhe der Expression von CD147 mit den klinisch-pathologischen Charakteristika sowie in vielen Fällen mit dem tumorspezifischen Überleben assoziiert war. Demnach könnte CD147 als prognostischer Faktor herangezogen werden. Die Entdeckung von neuen Biomarkern, die das Outcome besser vorhersagen, ist gerade für das Nierenzellkarzinom wichtig, da momentan vorhandene Prognose-Scores zu ungenau in der Vorhersage des Überlebens sind. Auch konnte in vergangenen Studien in Zelllinien und Tierexperimenten gezeigt werden, dass eine Inhibierung von CD147 durch entweder Antikörper oder RNA-Interferenzen in einer Abnahme der Tumorprogression, Metastasierung und sogar zur Apoptose von Tumorzellen in Folge einer intrazellulären Azidose endete.

Das Ziel dieser Studie war es, die Expression von CD147 auf Proteinebene im Gewebe des klarzelligem Nierenzellkarzinoms und korrespondierenden Normalgewebe in 2 unabhängigen Kohorten (Kohorte 1 und 3) nachzuweisen und im Anschluss dessen prognostische Bedeutung im Vergleich zur Proteinexpression von MCT4 zu bewerten. Dabei sollte im ersten Schritt das Verfahren der automatisierten Auswertung von immunhistochemischen Färbungen mittels Tissue Studio (Definiens AG) auch für Gewebe des

Nierenzellkarzinoms evaluiert werden. Zudem wurde die Expression von CD147 auf mRNA Ebene mittels vorhandener Daten aus dem IKP Stuttgart analysiert und deren Vorhersagekraft das Outcome betreffend bewertet. Dies geschah an einer Kohorte bei der zusätzlich zu dem in Paraffin-eingebetteten Gewebe gefrorenes Frischgewebe vorhanden war (Kohorte 3). Darüber hinaus wurden hierzu die Daten des TCGA (Kohorte 2) analysiert. Inhalt der Studie waren 245 Patienten mit einem histologisch gesicherten klarzelligen Nierenzellkarzinom, die im Zeitraum von 1993 bis 2010 chirurgisch therapiert wurden. Die letzte Follow-up Erhebung erfolgte im November 2014.

Untersucht wurde die Fragestellung anhand immunhistochemischer Färbungen von Tissue Microarrays. Der für die immunhistochemische Färbung verwendete Antikörper wurde durch einen Knockdown mittels siRNA in 4 Zelllinien des Nierenzellkarzinoms mit anschließenden Western-Blot-Analysen validiert. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte zusätzlich zur manuellen Auswertung auch mit dem Software-basierten Analyseprogramm Tissue Studio (Definiens AG). Korrelationsanalysen zeigten zwischen der manuellen und automatisierten Software-basierten Auswertung eine gute Korrelation.

Für die betrachteten Kohorten 1 und 3 war insgesamt die Expression von CD147 im tumorfreen Normalgewebe, verglichen mit dem dazugehörigen Nierentumorgewebe, in 66 % der Fälle höher. In 34 % der Fälle war die Expression im Nierentumorgewebe höher. Nur in einer der untersuchten Kohorten (Kohorte 1) trat eine Assoziation zwischen einer erhöhten Proteinexpression von CD147 mit einem höheren Tumorstadium, dem Auftreten von Metastasen sowie einem schlechten Tumor-abhängigen Überleben auf. Eine Assoziation der Proteinexpression von CD147 mit den klinisch-pathologischen Parametern sowie dem tumorspezifischen Überleben konnte in der Kohorte 3 nicht bestätigt werden. In den Analysen zur Expression von CD147 auf mRNA-Ebene der Kohorte 3 sowie in den RNA-Sequenzierungsdaten von TCGA zeigte sich ebenfalls, dass die mRNA-Expression von CD147 im Normalgewebe und im Nierentumorgewebe vergleichbar hoch waren. In beiden Kohorten konnte keine Assoziation

zwischen der Expressionshöhe von CD147 auf mRNA-Ebene und den klinisch-pathologischen Eigenschaften bzw. dem Überleben der Patienten gefunden werden.

Im Vergleich der hier gewonnenen Daten mit den Ergebnissen einer vergangenen Untersuchung mit Färbungen für MCT4 am Gewebe der Kohorten 1 und 3 am IKP Stuttgart konnte sich MCT4 im direkten Vergleich zu CD147 im positiven Sinne als prognostischer Marker abheben. Obwohl in dieser Arbeit somit die Stärke des Proteins CD147 als prognostischer Marker und therapeutischer Angriffspunkt in den hier untersuchten Gewebeproben des klarzelligen Nierenzellkarzinoms nicht einheitlich bestätigt werden konnte, geht in nächster Zeit die Forschung an CD147 weiter. Im Ausblick könnte so eventuell durch zielgerichtete Inhibierung eine neue wichtige Therapieoption bei verschiedenen Tumorarten erreicht werden und durch die Entwicklung von neuen Therapeutika eine selektive Inhibierung der tumorigenen Prozesse mit Beteiligung von CD147 erreicht werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Ljungberg, B., et al., *EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update*. Eur Urol., 2015. **67**(5): p. 913-24.
2. Robert Koch Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, *Krebs in Deutschland 2011/2012*. 2015. **10. Ausgabe**.
3. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012*. Eur J Cancer., 2013. **49**(6): p. 1374-403.
4. Levi, F., et al., *The changing pattern of kidney cancer incidence and mortality in Europe*. BJU Int., 2008. **101**(8): p. 949-58.
5. Rini, B.I., S.C. Campbell, and B. Escudier, *Renal cell carcinoma*. Lancet., 2009. **373**(9669): p. 1119-32.
6. Oosterwijk, E., et al., *Basic research in kidney cancer*. Eur Urol., 2011. **60**(4): p. 622-33.
7. Kovacs, G., et al., *The Heidelberg classification of renal cell tumours*. J Pathol., 1997. **183**(2): p. 131-3.
8. Shen, S.S., et al., *Kidney-specific cadherin, a specific marker for the distal portion of the nephron and related renal neoplasms*. Mod Pathol., 2005. **18**(7): p. 933-40.
9. Hunt, J.D., et al., *Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies*. Int J Cancer., 2005. **114**(1): p. 101-8.
10. Yuan, J.M., et al., *Tobacco use in relation to renal cell carcinoma*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev., 1998. **7**(5): p. 429-33.
11. Bjørge, T., S. Tretli, and A. Engeland, *Relation of height and body mass index to renal cell carcinoma in two million Norwegian men and women*. Am J Epidemiol., 2004. **160**(12): p. 1168-76.
12. van Dijk, B.A., et al., *Relation of height, body mass, energy intake, and physical activity to risk of renal cell carcinoma: results from the Netherlands Cohort Study*. Am J Epidemiol., 2004. **160**(12): p. 1159-67.
13. Pischon, T., et al., *Body size and risk of renal cell carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)*. Int J Cancer., 2006. **118**(3): p. 728-38.
14. McLaughlin, J.K., et al., *International renal-cell cancer study. VIII. Role of diuretics, other anti-hypertensive medications and hypertension*. Int J Cancer., 1995. **63**(2): p. 216-21.
15. McCredie, M., et al., *International renal-cell cancer study. II. Analgesics*. Int J Cancer., 1995. **60**(3): p. 345-9.
16. Gago-Dominguez, M., et al., *Regular use of analgesics is a risk factor for renal cell carcinoma*. Br J Cancer., 1999. **81**(3): p. 542-8.
17. Partanen, T., et al., *Renal cell cancer and occupational exposure to chemical agents*. Scand J Work Environ Health., 1991. **17**(4): p. 231-9.
18. Brüning, T., et al., *Renal cell cancer risk and occupational exposure to trichloroethylene: results of a consecutive case-control study in Arnsberg, Germany*. Am J Ind Med., 2003. **43**(3): p. 274-85.
19. Hofmann, J.N., et al., *The association between chronic renal failure and renal cell carcinoma may differ between black and white Americans*. Cancer Causes Control., 2013. **24**(1): p. 167-74.
20. Vamvakas, S., U. Bahner, and A. Heidland, *Cancer in end-stage renal disease: potential factors involved*. Am J Nephrol., 1998. **18**(2): p. 89-95.
21. Ishikawa, I., et al., *Twenty-year follow-up of acquired renal cystic disease*. Clin Nephrol., 2003. **59**(3): p. 153-9.
22. Bellocco, R., et al., *Alcohol drinking and risk of renal cell carcinoma: results of a meta-analysis*. Ann Oncol., 2012. **23**(9): p. 2235-44.
23. Rakowski, S.K., et al., *Renal manifestations of tuberous sclerosis complex: Incidence, prognosis, and predictive factors*. Kidney Int., 2006. **70**(10): p. 1777-82.
24. Zbar, B., et al., *Risk of renal and colonic neoplasms and spontaneous pneumothorax in the Birt-Hogg-Dubé syndrome*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev., 2002. **11**(4): p. 393-400.
25. Maher, E.R., et al., *Clinical features and natural history of von Hippel-Lindau disease*. Q J Med., 1990. **77**(283): p. 1151-63.

26. Maher, E.R. and W.G. Kaelin, *von Hippel-Lindau disease*. *Medicine (Baltimore)*. 1997. **76**(6): p. 381-91.
27. Kondo, K., et al., *Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein*. *Cancer Cell.*, 2002. **1**(3): p. 237-46.
28. Latif, F., et al., *Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene*. *Science.*, 1993. **260**(5112): p. 1317-20.
29. Nickerson, M.L., et al., *Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors*. *Clin Cancer Res.*, 2008. **14**(15): p. 4726-34.
30. Banks, R.E., et al., *Genetic and epigenetic analysis of von Hippel-Lindau (VHL) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer*. *Cancer Res.*, 2006. **66**(4): p. 2000-11.
31. Pfaffenroth, E.C. and W.M. Linehan, *Genetic basis for kidney cancer: opportunity for disease-specific approaches to therapy*. *Expert Opin Biol Ther.*, 2008. **8**(6): p. 779-90.
32. Jonasch, E., et al., *State of the science: an update on renal cell carcinoma*. *Mol Cancer Res.*, 2012. **10**(7): p. 859-80.
33. Curti, B.D., *Renal cell carcinoma*. *JAMA.*, 2004. **292**(1): p. 97-100.
34. Bedke, J., et al., *Paraneoplastische Syndrome des Nierenzellkarzinoms*. *Der Urologe.*, 2007. **46**(1): p. 45-8.
35. Gill, I.S., et al., *Clinical practice. Small renal mass*. *N Engl J Med.*, 2010. **362**(7): p. 624-34.
36. Jayson, M. and H. Sanders, *Increased incidence of serendipitously discovered renal cell carcinoma*. *Urology.*, 1998. **51**(2): p. 203-5.
37. Luciani, L.G., R. Cestari, and C. Tallarigo, *Incidental renal cell carcinoma-age and stage characterization and clinical implications: study of 1092 patients (1982-1997)*. *Urology.*, 2000. **56**(1): p. 58-62.
38. Warren, K.S. and J. McFarlane, *The Bosniak classification of renal cystic masses*. *BJU Int.*, 2005. **95**(7): p. 939-42.
39. Eggener, S., *TNM staging for renal cell carcinoma: time for a new method*. *Eur Urol.*, 2010. **58**(4): p. 517-9.
40. Van Poppel, H., et al., *Treatment of localised renal cell carcinoma*. *Eur Urol.*, 2011. **60**(4): p. 662-72.
41. Van Poppel, H., et al., *A prospective, randomised EORTC intergroup phase 3 study comparing the oncologic outcome of elective nephron-sparing surgery and radical nephrectomy for low-stage renal cell carcinoma*. *Eur Urol.*, 2011. **59**(4): p. 543-52.
42. Capitano, U., et al., *Nephron-sparing techniques independently decrease the risk of cardiovascular events relative to radical nephrectomy in patients with a T1a-T1b renal mass and normal preoperative renal function*. *Eur Urol.*, 2015. **67**(4): p. 683-9.
43. MacLennan, S., et al., *Systematic review of oncological outcomes following surgical management of localised renal cancer*. *Eur Urol.*, 2012. **61**(5): p. 972-93.
44. MacLennan, S., et al., *Systematic review of perioperative and quality-of-life outcomes following surgical management of localised renal cancer*. *Eur Urol.*, 2012. **62**(6): p. 1097-117.
45. Gill, I.S., et al., *Comparison of 1,800 laparoscopic and open partial nephrectomies for single renal tumors*. *J Urol.*, 2007. **178**(1): p. 41-6.
46. Marszalek, M., et al., *Laparoscopic and open partial nephrectomy: a matched-pair comparison of 200 patients*. *Eur Urol.*, 2009. **55**(5): p. 1171-8.
47. Benway, B.M. and S.B. Bhayani, *Surgical outcomes of robot-assisted partial nephrectomy*. *BJU Int.*, 2011. **108**(6 Pt 2): p. 955-61.
48. Tsui, K.H., et al., *Prognostic indicators for renal cell carcinoma: a multivariate analysis of 643 patients using the revised 1997 TNM staging criteria*. *J Urol.*, 2000. **163**(4): p. 1090-5.
49. May, M., et al., *Pre-operative renal arterial embolisation does not provide survival benefit in patients with radical nephrectomy for renal cell carcinoma*. *Br J Radiol.*, 2009. **82**(981): p. 724-31.
50. Whitson, J.M., C.R. Harris, and M.V. Meng, *Population-based comparative effectiveness of nephron-sparing surgery vs ablation for small renal masses*. *BJU Int.*, 2012. **110**(10): p. 1438-43.

51. Jewett, M.A., et al., *Active surveillance of small renal masses: progression patterns of early stage kidney cancer*. Eur Urol., 2011. **60**(1): p. 39-44.
52. Dabestani, S., et al., *Local treatments for metastases of renal cell carcinoma: a systematic review*. Lancet Oncol., 2014. **15**(12): p. e549-61.
53. Flanigan, R.C., et al., *Cytoreductive nephrectomy in patients with metastatic renal cancer: a combined analysis*. J Urol., 2004. **171**(3): p. 1071-6.
54. Motzer, R.J., et al., *Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma*. J Clin Oncol., 1999. **17**(8): p. 2530-40.
55. Fosså, S.D., *Interferon in metastatic renal cell carcinoma*. Semin Oncol., 2000. **27**(2): p. 187-93.
56. Figlin, R.A., *Renal cell carcinoma: management of advanced disease*. J Urol., 1999. **161**(2): p. 381-6.
57. Patard, J.J., N. Rioux-Leclercq, and P. Fergelot, *Understanding the importance of smart drugs in renal cell carcinoma*. Eur Urol., 2006. **49**(4): p. 633-43.
58. Motzer, R.J., et al., *Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma*. N Engl J Med., 2007. **356**(2): p. 115-24.
59. Escudier, B., et al., *Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): final analysis of overall survival*. J Clin Oncol., 2010 **28**(13): p. 2144-50.
60. Hudes, G., et al., *Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma*. N Engl J Med., 2007. **356**(22): p. 2271-81.
61. Albiges, L., et al., *A systematic review of sequencing and combinations of systemic therapy in metastatic renal cancer*. Eur Urol., 2015. **67**(1): p. 100-10.
62. Heng, D.Y., et al., *External validation and comparison with other models of the International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium prognostic model: a population-based study*. Lancet Oncol., 2013. **14**(2): p. 141-8.
63. Massari, F., et al., *Adjuvant treatment for resected renal cell carcinoma: are all strategies equally negative? Potential implications for trial design with targeted agents*. Clin Genitourin Cancer., 2013. **11**(4): p. 471-6.
64. Amin, M.B., et al., *Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: an experience of 405 cases*. Am J Surg Pathol., 2002. **26**(3): p. 281-91.
65. Ficarra, V., et al., *Preoperative aspects and dimensions used for an anatomical (PADUA) classification of renal tumours in patients who are candidates for nephron-sparing surgery*. Eur Urol., 2009. **56**(5): p. 786-93.
66. Patard, J.J., et al., *Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: a multicenter experience*. J Clin Oncol., 2005. **23**(12): p. 2763-71.
67. Motzer, R.J., et al., *Prognostic factors for survival in previously treated patients with metastatic renal cell carcinoma*. J Clin Oncol., 2004 **22**(3): p. 454-63.
68. Zisman, A., et al., *Improved prognostication of renal cell carcinoma using an integrated staging system*. J Clin Oncol., 2001. **19**(6): p. 1649-57.
69. Patard, J.J., et al., *Use of the University of California Los Angeles integrated staging system to predict survival in renal cell carcinoma: an international multicenter study*. J Clin Oncol., 2004. **22**(16): p. 3316-22.
70. Leibovich, B.C., et al., *Prediction of progression after radical nephrectomy for patients with clear cell renal cell carcinoma: a stratification tool for prospective clinical trials*. Cancer., 2003. **97**(7): p. 1663-71.
71. Howlader, N., et al., *SEER Cancer Statistics Review 1975-2013 National Cancer Institute*. 2016.
72. Motzer, R.J., N.H. Bander, and D.M. Nanus, *Renal-cell carcinoma*. N Engl J Med., 1996. **335**(12): p. 865-75.
73. Phillips, G.K. and M.B. Atkins, *New agents and new targets for renal cell carcinoma*. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2014: p. e222-7.
74. Liang, Y.X., et al., *CD147 and VEGF expression in advanced renal cell carcinoma and their prognostic value*. Cancer Invest., 2009. **27**(7): p. 788-93.
75. Biswas, C., et al., *The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily*. Cancer Res., 1995. **55**(2): p. 434-9.

76. Miyauchi, T., Y. Masuzawa, and T. Muramatsu, *The basigin group of the immunoglobulin superfamily: complete conservation of a segment in and around transmembrane domains of human and mouse basigin and chicken HT7 antigen*. J Biochem., 1991. **110**(5): p. 770-4.
77. Kasinrerkerk, W., et al., *Human leukocyte activation antigen M6, a member of the Ig superfamily, is the species homologue of rat OX-47, mouse basigin, and chicken HT7 molecule*. J Immunol., 1992. **149**(3): p. 847-54.
78. Jiang, J.L., et al., *The involvement of HAb18G/CD147 in regulation of store-operated calcium entry and metastasis of human hepatoma cells*. J Biol Chem., 2001. **276**(50): p. 46870-7.
79. Fossum, S., S. Mallett, and A.N. Barclay, *The MRC OX-47 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily with an unusual transmembrane sequence*. Eur J Immunol., 1991. **21**(3): p. 671-9.
80. Seulberger, H., F. Lottspeich, and W. Risau, *The inducible blood-brain barrier specific molecule HT7 is a novel immunoglobulin-like cell surface glycoprotein*. EMBO J. , 1990. **9**(7): p. 2151-8.
81. Seulberger, H., C.M. Unger, and W. Risau, *HT7, Neurothelin, Basigin, gp42 and OX-47-many names for one developmentally regulated immuno-globulin-like surface glycoprotein on blood-brain barrier endothelium, epithelial tissue barriers and neurons*. Neurosci Lett., 1992. **140**(1): p. 93-7.
82. Li, R., et al., *Basigin (murine EMMPRIN) stimulates matrix metalloproteinase production by fibroblasts*. J Cell Physiol., 2001. **186**(3): p. 371-9.
83. Koch, C., et al., *T cell activation-associated epitopes of CD147 in regulation of the T cell response, and their definition by antibody affinity and antigen density*. Int Immunol., 1999. **11**(5): p. 777-86.
84. Yu, X.L., et al., *Crystal structure of HAb18G/CD147: implications for immunoglobulin superfamily homophilic adhesion*. J Biol Chem., 2008. **283**(26): p. 18056-65.
85. Biswas, C., *Tumor cell stimulation of collagenase production by fibroblasts*. Biochem Biophys Res Commun., 1982. **109**(3): p. 1026-34.
86. Caudroy, S., et al., *EMMPRIN-mediated MMP regulation in tumor and endothelial cells*. Clin Exp Metastasis., 2002. **19**(8): p. 697-702.
87. Ellis, S.M., K. Nabeshima, and C. Biswas, *Monoclonal antibody preparation and purification of a tumor cell collagenase-stimulatory factor*. Cancer Res., 1989. **49**(12): p. 3385-91.
88. Bauer, E.A., et al., *Keratinocyte- and tumor-derived inducers of collagenase*. Ann N Y Acad Sci., 1988. **548**: p. 174-9.
89. Noguchi, Y., et al., *Identification and characterization of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human endometrium during the menstrual cycle in vivo and in vitro*. J Clin Endocrinol Metab., 2003. **88**(12): p. 6063-72.
90. Chen, H., et al., *CD147 is required for matrix metalloproteinases-2 production and germ cell migration during spermatogenesis*. Mol Hum Reprod., 2011. **17**(7): p. 405-14.
91. Fok, K.L., et al., *Novel regulators of spermatogenesis*. Semin Cell Dev Biol., 2014. **29**: p. 31-42.
92. Chen, H., et al., *New insights into germ cell migration and survival/apoptosis in spermatogenesis: Lessons from CD147*. Spermatogenesis., 2012. **2**(4): p. 264-272.
93. Lee, C.L., et al., *Identification of CD147 (basigin) as a mediator of trophoblast functions*. Hum Reprod., 2013. **28**(11): p. 2920-9.
94. Igakura, T., et al., *A null mutation in basigin, an immunoglobulin superfamily member, indicates its important roles in peri-implantation development and spermatogenesis*. Dev Biol., 1998. **194**(2): p. 152-65.
95. Kuno, N., et al., *Female sterility in mice lacking the basigin gene, which encodes a transmembrane glycoprotein belonging to the immunoglobulin superfamily*. FEBS Lett., 1998. **425**(2): p. 191-4.
96. Hori, K., et al., *Retinal dysfunction in basigin deficiency*. Invest Ophthalmol Vis Sci., 2000. **41**(10): p. 3128-33.
97. Naruhashi, K., et al., *Abnormalities of sensory and memory functions in mice lacking Bsg gene*. Biochem Biophys Res Commun., 1997. **236**(3): p. 733-7.

98. Schlosshauer, B. and K.H. Herzog, *Neurothelin: an inducible cell surface glycoprotein of blood-brain barrier-specific endothelial cells and distinct neurons*. J Cell Biol., 1990. **110**(4): p. 1261-74.
99. Haug, C., et al., *Oxidized low-density lipoproteins stimulate extracellular matrix metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) release by coronary smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2004. **24**(10): p. 1823-9.
100. Yoon, Y.W., et al., *Upstream regulation of matrix metalloproteinase by EMMPRIN; extracellular matrix metalloproteinase inducer in advanced atherosclerotic plaque*. Atherosclerosis., 2005. **180**(1): p. 37-44.
101. Spinale, F.G., et al., *A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure*. Circulation., 2000. **102**(16): p. 1944-9.
102. Yamani, M.H., et al., *Acute vascular rejection is associated with up-regulation of vitronectin receptor (alpha v beta 3), increased expression of tissue factor, and activation of the extracellular matrix metalloproteinase induction system*. J Heart Lung Transplant., 2002. **21**(9): p. 983-9.
103. Gabison, E.E., et al., *Differential expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) in normal and ulcerated corneas: role in epithelio-stromal interactions and matrix metalloproteinase induction*. Am J Pathol., 2005. **166**(1): p. 209-19.
104. Foda, H.D., et al., *Ventilator-induced lung injury upregulates and activates gelatinases and EMMPRIN: attenuation by the synthetic matrix metalloproteinase inhibitor, Prinomastat (AG3340)*. Am J Respir Cell Mol Biol., 2001. **25**(6): p. 717-24.
105. Betsuyaku, T., et al., *Increased basigin in bleomycin-induced lung injury*. Am J Respir Cell Mol Biol., 2003. **28**(5): p. 600-6.
106. Zhang, D.W., et al., *HAb18G/CD147 promotes activation of hepatic stellate cells and is a target for antibody therapy of liver fibrosis*. J Hepatol., 2012. **57**(6): p. 1283-91.
107. Agrawal, S.M., et al., *Extracellular matrix metalloproteinase inducer shows active perivascular cuffs in multiple sclerosis*. Brain., 2013. **136**(Pt 6): p. 1760-77.
108. Agrawal, S.M., et al., *EMMPRIN: a novel regulator of leukocyte transmigration into the CNS in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neurosci., 2011. **31**(2): p. 669-77.
109. Crosnier, C., et al., *Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum*. Nature., 2011. **480**(7378): p. 534-7.
110. Williams, A.R., et al., *Enhancing blockade of Plasmodium falciparum erythrocyte invasion: assessing combinations of antibodies against PfRH5 and other merozoite antigens*. PLoS Pathog., 2012. **8**(11): p. e1002991?????
111. Bernard, S.C., et al., *Pathogenic Neisseria meningitidis utilizes CD147 for vascular colonization*. Nat Med., 2014. **20**(7): p. 725-31.
112. Pistol, G., et al., *Roles of CD147 on T lymphocytes activation and MMP-9 secretion in systemic lupus erythematosus*. J Cell Mol Med., 2007. **11**(2): p. 339-48.
113. Maeda-Hori, M., et al., *Plasma CD147 reflects histological features in patients with lupus nephritis*. Lupus., 2014. **23**(4): p. 342-52.
114. Tomita, T., et al., *Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum., 2002. **46**(2): p. 373-8.
115. Konttinen, Y.T., et al., *Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in rheumatoid synovium*. Arthritis Rheum., 2000. **43**(2): p. 275-80.
116. Liotta, L.A., P.S. Steeg, and W.G. Stetler-Stevenson, *Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation*. Cell., 1991. **64**(2): p. 327-36.
117. Nagase, H. and J.F. Woessner, *Matrix metalloproteinases*. J Biol Chem., 1999. **274**(31): p. 21491-4.
118. Gray, S.T., R.J. Wilkins, and K. Yun, *Interstitial collagenase gene expression in oral squamous cell carcinoma*. Am J Pathol., 1992. **141**(2): p. 301-6.
119. Sasaguri, Y., et al., *Production of matrix metalloproteinases 2 and 3 (stromelysin) by stromal cells of giant cell tumor of bone*. Am J Pathol., 1992. **141**(3): p. 611-21.

120. Okada, A., et al., *Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas.* Proc Natl Acad Sci U S A., 1995. **92**(7): p. 2730-4.
121. Basset, P., et al., *A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas.* Nature., 1990. **348**(6303): p. 699-704.
122. Rubin, H., *Cancer as a dynamic developmental disorder.* Cancer Res., 1985. **45**(7): p. 2935-42.
123. Weinberg, R.A., *Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis.* Cancer Res., 1989. **49**(14): p. 3713-21.
124. Fidler, I.J., *Origin and biology of cancer metastasis.* Cytometry., 1989. **10**(6): p. 673-80.
125. Polette, M., et al., *Tumor collagenase stimulatory factor (TCSF) expression and localization in human lung and breast cancers.* J Histochem Cytochem., 1997. **45**(5): p. 703-9.
126. Zhou, J., et al., *Involvement of CD147 in overexpression of MMP-2 and MMP-9 and enhancement of invasive potential of PMA-differentiated THP-1.* BMC Cell Biol., 2005. **17**(6): p.???????
127. Kanekura, T., X. Chen, and T. Kanzaki, *Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts.* Int J Cancer., 2002. **99**(4): p. 520-8.
128. Yang, J.M., et al., *Overexpression of Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer in Multidrug Resistant Cancer Cells.* Mol Cancer Res., 2003. **1**(6): p. 420-7.
129. Liang, L., T. Major, and T. Bocan, *Characterization of the promoter of human extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN).* Gene., 2002. **282**(1-2): p. 75-86.
130. Kaname, T., et al., *Mapping basigin (BSG), a member of the immunoglobulin superfamily, to 19p13.3.* Cytogenet Cell Genet., 1993. **64**(3-4): p. 195-7.
131. Yoshida, S., et al., *Homo-oligomer formation by basigin, an immunoglobulin superfamily member, via its N-terminal immunoglobulin domain.* Eur J Biochem., 2000. **267**(14): p. 4372-80.
132. Rosenthal, E.L., et al., *Extracellular matrix metalloprotease inducer-expressing head and neck squamous cell carcinoma cells promote fibroblast-mediated type I collagen degradation in vitro.* Mol Cancer Res., 2005. **3**(4): p. 195-202.
133. Gabison, E.E., et al., *EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair.* Biochimie., 2005. **87**(3-4): p. 361-8.
134. Tang, W., S.B. Chang, and M.E. Hemler, *Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1.* Mol Biol Cell., 2004. **15**(9): p. 4043-50.
135. Sun, J. and M.E. Hemler, *Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions.* Cancer Res., 2001. **61**(5): p. 2276-81.
136. Belton, R.J., et al., *Basigin-2 is a cell surface receptor for soluble basigin ligand.* J Biol Chem., 2008. **283**(26): p. 17805-14.
137. Nabeshima, K., et al., *Emmprin (basigin/CD147): matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression.* Pathol Int, 2006. **56**(7): p. 359-67.
138. Tang, W. and M.E. Hemler, *Caveolin-1 regulates matrix metalloproteinases-1 induction and CD147/EMMPRIN cell surface clustering.* J Biol Chem., 2004. **279**(12): p. 11112-8.
139. Nabeshima, K., et al., *Expression of emmprin and matrix metalloproteinases (MMPs) in peripheral nerve sheath tumors: emmprin and membrane-type (MT)1-MMP expressions are associated with malignant potential.* Anticancer Res., 2006. **26**(2B): p. 1359-67.
140. Muramatsu, T. and T. Miyauchi, *Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion.* Histol Histopathol., 2003. **18**(3): p. 981-7.
141. Yurchenko, V., et al., *Regulation of CD147 cell surface expression: involvement of the proline residue in the CD147 transmembrane domain.* J Biol Chem., 2005. **280**(17): p. 17013-9.
142. Manoharan, C., et al., *The role of charged residues in the transmembrane helices of monocarboxylate transporter 1 and its ancillary protein basigin in determining plasma membrane expression and catalytic activity.* Mol Membr Biol., 2006. **23**(6): p. 486-98.

143. Tang, Y., et al., *Tumor-stroma interaction: positive feedback regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression and matrix metalloproteinase-dependent generation of soluble EMMPRIN*. Mol Cancer Res., 2004. **2**(2): p. 73-80.
144. Bordador, L.C., et al., *Expression of emmprin by oral squamous cell carcinoma*. Int J Cancer., 2000. **85**(3): p. 347-52.
145. Sidhu, S.S., et al., *The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor-stromal interactions*. Oncogene., 2004. **23**(4): p. 956-63.
146. Caudroy, S., et al., *Expression of the extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and the matrix metalloproteinase-2 in bronchopulmonary and breast lesions*. J Histochem Cytochem., 1999. **47**(12): p. 1575-80.
147. Weidle, U.H., et al., *Cancer-related issues of CD147*. Cancer Genomics Proteomics., 2010. **7**(3): p. 157-69.
148. Kirk, P., et al., *CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression*. EMBO J, 2000. **19**(15): p. 3896-904.
149. Choi, J.W., et al., *Prognostic significance of lactate/proton symporters MCT1, MCT4, and their chaperone CD147 expressions in urothelial carcinoma of the bladder*. Urology., 2014. **84**(1): p. 245.e9-15.
150. Walters, D.K., B.K. Arendt, and D.F. Jelinek, *CD147 regulates the expression of MCT1 and lactate export in multiple myeloma cells*. Cell Cycle., 2013. **12**(19): p. 3175-83.
151. Blood, C.H. and B.R. Zetter, *Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis*. Biochim Biophys Acta., 1990. **1032**(1): p. 89-118.
152. Tang, Y., et al., *Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases*. Cancer Res, 2005. **65**(8): p. 3193-9.
153. Yurchenko, V., et al., *Cyclophilin-CD147 interactions: a new target for anti-inflammatory therapeutics*. Clin Exp Immunol., 2010. **160**(3): p. 305-17.
154. Poon, R.T., et al., *Serum vascular endothelial growth factor predicts venous invasion in hepatocellular carcinoma: a prospective study*. Ann Surg., 2001. **233**(2): p. 227-35.
155. Lee, C.N., et al., *Angiogenesis of endometrial carcinomas assessed by measurement of intratumoral blood flow, microvessel density, and vascular endothelial growth factor levels*. Obstet Gynecol., 2000. **96**(4): p. 615-21.
156. Sato, M., et al., *EMMPRIN promotes angiogenesis, proliferation, invasion and resistance to sunitinib in renal cell carcinoma, and its level predicts patient outcome*. PLoS One., 2013. **8**(9).
157. Amit-Cohen, B.C., M.M. Rahat, and M.A. Rahat, *Tumor cell-macrophage interactions increase angiogenesis through secretion of EMMPRIN*. Front Physiol, 2013. **4**(178): p. 1-16.
158. Marieb, E.A., et al., *Emmprin Promotes Anchorage-Independent Growth in Human Mammary Carcinoma Cells by Stimulating Hyaluronan Production*. Cancer Res., 2004. **64**(4): p. 1229-32.
159. Zucker, S., et al., *Tumorigenic potential of extracellular matrix metalloproteinase inducer*. Am J Pathol., 2001. **158**(6): p. 1921-8.
160. Xiong, L., C.K. Edwards, and L. Zhou, *The biological function and clinical utilization of CD147 in human diseases: a review of the current scientific literature*. Int J Mol Sci., 2014. **15**(10): p. 17411-41.
161. Fukuoka, M., et al., *Expression patterns of emmprin and monocarboxylate transporter-1 in ovarian epithelial tumors*. Virchows Arch., 2012. **461**(4): p. 457-66.
162. Zhao, Y., et al., *The role of EMMPRIN expression in ovarian epithelial carcinomas*. Cell Cycle., 2013. **12**(17): p. 2899-913.
163. Nakamura, K., et al., *Role of emmprin in endometrial cancer*. BMC Cancer., 2012. **12**??(191??): p.??
164. Pinheiro, C., et al., *Monocarboxylate transporters 1 and 4 are associated with CD147 in cervical carcinoma*. Dis Markers., 2009. **26**(3): p. 97-103.
165. Ju, X.Z., et al., *EMMPRIN expression as a prognostic factor in radiotherapy of cervical cancer*. Clin Cancer Res., 2008. **14**(2): p. 494-501.
166. Ishibashi, Y., et al., *CD147 and matrix metalloproteinase-2 protein expression as significant prognostic factors in esophageal squamous cell carcinoma*. Cancer., 2004. **101**(9): p. 1994-2000.

167. Marionnet, C., et al., *Differential molecular profiling between skin carcinomas reveals four newly reported genes potentially implicated in squamous cell carcinoma development*. *Oncogene.*, 2003. **22**(22): p. 3500-5.
168. Nabeshima, K., et al., *Emmprin, a cell surface inducer of matrix metalloproteinases (MMPs), is expressed in T-cell lymphomas*. *J Pathol.*, 2004. **202**(3): p. 341-51.
169. Sameshima, T., et al., *Expression of emmprin (CD147), a cell surface inducer of matrix metalloproteinases, in normal human brain and gliomas*. *Int J Cancer.*, 2000. **88**(1): p. 21-7.
170. Abraham, D., et al., *Host CD147 blockade by small interfering RNAs suppresses growth of human colon cancer xenografts*. *Front Biosci.*, 2008. **13**: p. 5571-9.
171. Zhu, S., et al., *Expression and clinical implications of HAb18G/CD147 in hepatocellular carcinoma*. *Hepatol Res.*, 2015. **45**(1): p. 97-106.
172. Muraoka, K., et al., *Enhanced expression of a tumor-cell-derived collagenase-stimulatory factor in urothelial carcinoma: its usefulness as a tumor marker for bladder cancers*. *Int J Cancer.*, 1993. **55**(1): p. 19-26.
173. Zhong, W.D., et al., *CD147, MMP-1, MMP-2 and MMP-9 Protein Expression as Significant Prognostic Factors in Human Prostate Cancer*. *Oncology*, 2008. **75**(3-4): p. 230-6.
174. Lu, Q., et al., *Expression and clinical significance of extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPRIN/CD147, in human osteosarcoma*. *Oncol Lett.*, 2013. **5**(1): p. 201-207.
175. Jin, J.S., et al., *Increasing expression of extracellular matrix metalloprotease inducer in renal cell carcinoma: tissue microarray analysis of immunostaining score with clinicopathological parameters*. *Int J Urol*, 2006. **13**(5): p. 573-80.
176. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. *Science.*, 1956. **123**(3191): p. 309-14.
177. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell.*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
178. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. *Science.*, 2009. **324**(5930): p. 1029-33.
179. Ke, X., et al., *Hypoxia upregulates CD147 through a combined effect of HIF-1 α and Sp1 to promote glycolysis and tumor progression in epithelial solid tumors*. *Carcinogenesis.*, 2012. **33**(8): p. 1598-607.
180. Yang, H., W. Zou, and B. Chen, *Overexpression of CD147 in ovarian cancer is initiated by the hypoxic microenvironment*. *Cell Biol Int.*, 2013. **37**(10): p. 1139-42.
181. Kennedy, K.M. and M.W. Dewhirst, *Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation*. *Future Oncol.*, 2010. **6**(1): p. 127-48.
182. Fisel, P., et al., *DNA methylation of the SLC16A3 promoter regulates expression of the human lactate transporter MCT4 in renal cancer with consequences for clinical outcome*. *Clin Cancer Res.*, 2013. **19**(18): p. 5170-81.
183. Keshari, K.R., et al., *Hyperpolarized ¹³C-pyruvate magnetic resonance reveals rapid lactate export in metastatic renal cell carcinomas*. *Cancer Res.*, 2013. **73**(2): p. 529-38.
184. Gerlinger, M., et al., *Genome-wide RNA interference analysis of renal carcinoma survival regulators identifies MCT4 as a Warburg effect metabolic target*. *J Pathol.*, 2012. **227**(2): p. 146-56.
185. Kobayashi, M., et al., *Inhibitory effects of statins on human monocarboxylate transporter 4*. *Int J Pharm.*, 2006. **317**(1): p. 19-25.
186. Liu, W., T.K. Choueiri, and E. Cho, *Statin use and the risk of renal cell carcinoma in 2 prospective US cohorts*. *Cancer.*, 2012. **118**(3): p. 797-803.
187. Han, M., et al., *MCT-4, A511/Basigin and EF5 expression patterns during early chick cardiomyogenesis indicate cardiac cell differentiation occurs in a hypoxic environment*. *Dev Dyn.*, 2006. **235**(1): p. 124-31.
188. Zhu, W., et al., *Upregulation of EMMPRIN after permanent focal cerebral ischemia*. *Neurochem Int.*, 2008. **52**(6): p. 1086-91.
189. Ullah, M.S., A.J. Davies, and A.P. Halestrap, *The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism*. *J Biol Chem.*, 2006. **281**(14): p. 9030-7.

190. Toole, B.P. and M.G. Slomiany, *Hyaluronan, CD44 and Emmprin: partners in cancer cell chemoresistance*. Drug Resist Updat., 2008. **11**(3): p. 110-21.
191. Toole, B.P., *Emmprin (CD147), a cell surface regulator of matrix metalloproteinase production and function*. Curr Top Dev Biol., 2003. **54**: p. 371-89.
192. Zhao, S., et al., *CD147 promotes MTX resistance by immune cells through up-regulating ABCG2 expression and function*. J Dermatol Sci., 2013. **70**(3): p. 182-9.
193. Tang, Y., et al., *Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression by EMMPRIN via the PI3K-Akt Signaling Pathway*. Mol Cancer Res, 2006. **4**(6): p. 371-377.
194. Jia, L., et al., *Silencing CD147 inhibits tumor progression and increases chemosensitivity in murine lymphoid neoplasm P388D1 cells*. Ann Hematol., 2009. **88**(8): p. 753-60.
195. Kuang, Y.H., et al., *RNA interference targeting the CD147 induces apoptosis of multi-drug resistant cancer cells related to XIAP depletion*. Cancer Lett., 2009. **276**(2): p. 189-95.
196. Han, Z.D., et al., *Expression and clinical significance of CD147 in genitourinary carcinomas*. J Surg Res, 2010. **160**(2): p. 260-7.
197. Zou, W., et al., *Inhibition of CD147 gene expression via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumorigenicity and increases chemosensitivity to paclitaxel in HO-8910pm cells*. Cancer Lett., 2007 **248**(2): p. 211-8.
198. Hao, J., et al., *In vitro and in vivo prostate cancer metastasis and chemoresistance can be modulated by expression of either CD44 or CD147*. PLoS One., 2012. **7**(8): p. e40716.
199. Dean, N.R., et al., *Anti-EMMPRIN monoclonal antibody as a novel agent for therapy of head and neck cancer*. Clin Cancer Res., 2009. **15**(12): p. 4058-65.
200. Schneiderhan, W., et al., *CD147 silencing inhibits lactate transport and reduces malignant potential of pancreatic cancer cells in in vivo and in vitro models*. Gut., 2009. **58**(10): p. 1391-8.
201. Chen, Z.N., et al., *Targeting radioimmunotherapy of hepatocellular carcinoma with iodine (131I) metuximab injection: clinical phase I/II trials*. Int J Radiat Oncol Biol Phys., 2006. **65**(2): p. 435-44.
202. Shou, Z.X., X. Jin, and Z.S. Zhao, *Upregulated expression of ADAM17 is a prognostic marker for patients with gastric cancer*. Ann Surg., 2012. **256**(6): p. 1014-22.
203. Yang, M., et al., *Prognostic significance of CD147 in patients with glioblastoma*. J Neurooncol., 2013. **115**(1): p. 19-26.
204. Xu, X.Y., et al., *Expression of HAb18G/CD147 and its localization correlate with the progression and poor prognosis of non-small cell lung cancer*. Pathol Res Pract., 2013. **209**(6): p. 345-52.
205. Yang, Q., et al., *Expression of COX-2, CD44v6 and CD147 and relationship with invasion and lymph node metastasis in hypopharyngeal squamous cell carcinoma*. PLoS One., 2013. **8**(9): p. e71048.
206. Riethdorf, S., et al., *High incidence of EMMPRIN expression in human tumors*. Int J Cancer, 2006. **119**(8): p. 1800-10.
207. Kim, Y., et al., *Expression of lactate/H⁺ symporters MCT1 and MCT4 and their chaperone CD147 predicts tumor progression in clear cell renal cell carcinoma: immunohistochemical and The Cancer Genome Atlas data analyses*. Hum Pathol., 2015. **46**(1): p. 104-12.
208. Pushparaj, P.N. and A.J. Melendez, *Short interfering RNA (siRNA) as a novel therapeutic*. Clin Exp Pharmacol Physiol., 2006. **33**(5-6): p. 504-10.
209. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem., 1985. **150**(1): p. 76-85.
210. LOWRY, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem., 1951. **193**(1): p. 265-75.
211. DAVIS, B.J., *DISC ELECTROPHORESIS. II. METHOD AND APPLICATION TO HUMAN SERUM PROTEINS*. Ann N Y Acad Sci., 1964. **121**: p. 404-27.
- 212.

https://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/bCourse_Information/4581/techniques/gel_elect/gel.jpg. Zugriff 28.08.2016.

213. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1979. **76**(9): p. 4350-4.
214. Burnette, W.N., "*Western blotting*": *electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Anal Biochem., 1981. **112**(2): p. 195-203.
215. Albrecht, S., H. Brandl, and W. Adam, *Chemilumineszenz-Reaktionen*. Chemie in unserer Zeit, 1990. **24**(5): p. 227–238.
216. Battifora, H., *The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing*. Lab Invest., 1986. **55**(2): p. 244-8.
217. Kononen, J., et al., *Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens*. Nat Med., 1998. **4**(7): p. 844-7.
218. Giltneane, J.M. and D.L. Rimm, *Technology insight: Identification of biomarkers with tissue microarray technology*. Nat Clin Pract Oncol., 2004. **1**(2): p. 104-11.
219. Cregger, M., A.J. Berger, and D.L. Rimm, *Immunohistochemistry and quantitative analysis of protein expression*. Arch Pathol Lab Med., 2006. **130**(7): p. 1026-30.
220. Rojo, M.G., G. Bueno, and J. Slodkowska, *Review of imaging solutions for integrated quantitative immunohistochemistry in the Pathology daily practice*. Folia Histochem Cytobiol., 2009. **47**(3): p. 349-54.
221. Kallioniemi, O.P., et al., *Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer*. Hum Mol Genet., 2001. **10**(7): p. 657-62.
222. Camp, R.L., L.A. Charette, and D.L. Rimm, *Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma*. Lab Invest., 2000. **80**(12): p. 1943-9.
223. Camp, R.L., G.G. Chung, and D.L. Rimm, *Automated subcellular localization and quantification of protein expression in tissue microarrays*. Nat Med., 2002. **8**(11): p. 1323-7.
224. Conway, C., et al., *Virtual microscopy as an enabler of automated/quantitative assessment of protein expression in TMAs*. Histochem Cell Biol., 2008. **130**(3): p. 447-63.
225. Fisel, P., et al., *MCT4 surpasses the prognostic relevance of the ancillary protein CD147 in clear cell renal cell carcinoma*. Oncotarget., 2015. **6**(31): p. 30615-27.
226. R Core Team, *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>. 2014.
227. Davison, A.C. and D.V. Hinkley, *Bootstrap Methods and Their Application*. 1997, Cambridge: Cambridge University Press.
228. Hothorn, T., K. Hornik, and A. Zeileis, *Unibased Recursive Partitioning: A Conditional Inference Framework*. J Comput Graph Stat., 2006. **15**: p. 651-74.
229. Therneau, M.T. and P.M. Grambsch, *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*. 2000, New York: Springer.
230. Gulati, S., et al., *Systematic evaluation of the prognostic impact and intratumour heterogeneity of clear cell renal cell carcinoma biomarkers*. Eur Urol., 2014. **66**(5): p. 936-48.
231. Tsai, W.C., et al., *Association of EMMPRIN and fascin expression in renal cell carcinoma: correlation with clinicopathological parameters*. World J Urol, 2007. **25**(1): p. 73-80.
232. Marchiq, I., et al., *Genetic disruption of lactate/H⁺ symporters (MCTs) and their subunit CD147/BASIGIN sensitizes glycolytic tumor cells to phenformin*. Cancer Res., 2015. **75**(1): p. 171-80.
233. Niu, H., et al., *Treatment of (131)I-labeled anti-CD147 monoclonal antibody in VX2 carcinoma-induced liver tumors*. Oncol Rep., 2013. **30**(1): p. 246-52.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Urologie Tübingen unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. J. Bedke durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit der Universitätsklinik für Urologie (Prof. Dr. med. J. Bedke), dem Institut für Pathologie und Neuropathologie in Tübingen (Dr. med. M. Scharpf) und dem Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie (IKP) am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart (Prof. Dr. med. M. Schwab, Dr. rer. nat. Elke Schäffeler).

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch die Labormitglieder U. Waldherr und Dr. rer. nat. P. Fisel von mir mit Unterstützung durch Frau U. Waldherr und Frau Dr. rer. nat. P. Fisel durchgeführt.

Vorhandene Daten zur Expression von MCT4 in den untersuchten Kohorten wurden mit Einverständnis von Frau Dr. rer. nat. P. Fisel und Herrn Prof. Dr. med. M. Schwab verwendet.

Die statistische Auswertung erfolgte durch den Mathematiker S. Winter aus dem IKP Stuttgart und wurde vom veröffentlichten Paper (Fisel et al. 2015) übernommen (siehe unter Punkt 8).

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

8. Veröffentlichung

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Fisel P., Stühler V., Bedke J., Winter S., Rausch S., Hennenlotter J., Nies, A. T., Stenzl A., Scharpf M., Fend F., Kruck S., Schwab M., Schaeffeler E. - MCT4 surpasses the prognostic relevance of the ancillary protein CD147 in clear cell renal cell carcinoma. - 2015 - Oncotarget. 6(31)- Seiten 30615-27.

9. Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. A. Stenzl, dem ärztlichen Direktor der Universitätsklinik für Urologie Tübingen, dafür danken, dass er die vorliegende Dissertation über dieses ebenso interessante wie auch relevante Thema möglich gemacht hat.

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. med. J. Bedke für die freundliche Überlassung des Themas, bei dem mir die Möglichkeit gegeben wurde bei der Findung sowie der späteren Ausgestaltung aktiv mitzuwirken. Darüber hinaus möchte ich mich für Ihre fachliche und menschliche Unterstützung sowie die Ermöglichung des Forschungsaufenthalts im IKP Stuttgart bedanken.

Bedanken möchte ich mich zudem bei Herrn Privatdozent Dr. med. S. Kruck für seine motivierenden Worte und jederzeit vorhandene menschliche und fachliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. med. M. Schwab danke ich für die Aufnahme in seinem Institut und die Möglichkeit erste Schritte experimenteller Arbeit im Labor zu wagen und mir auf diese Weise eine spannende Zeit, mit vielen neuen Erfahrungen zu ermöglichen.

Frau Dr. E. Schäffeler danke ich für die herzliche Aufnahme, die zuverlässige Betreuung und ihre ständig den Überblick bewahrende Art.

Frau Dr. P. Fisel danke ich für ihre Unterstützung in allen Bereichen, für ihre immer vorhandene Geduld und für die verständliche Erklärung meiner Fragen.

Für die gute Einarbeitung in sämtliche Prozesse der Laborarbeit, die hilfreichen Ratschläge, sowie die herzliche Unterstützung meines Tuns in jeglicher Hinsicht möchte ich mich bei Frau U. Waldherr bedanken.

Für die Hilfe bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen bedanke ich mich herzlich bei Herrn Dr. med. M. Scharpf (Pathologisches Institut der Universitätsklinik Tübingen).

Herzlich bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn S. Winter für die statistische Auswertung der Arbeit.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und hier vorallem meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben. Vielen Dank für eure immer währende Unterstützung und euer Verständnis.

10. Lebenslauf

Schulbildung

09/1995 - 07/1999

Besuch der Grundschule Schiller-Schule in Reutlingen

09/1999 - 07/2008

Besuch des Isolde-Kurz-Gymnasiums in Reutlingen

Freiwilliges Soziales Jahr

01.09.2008 - 31.08.2009

Freiwilliges Soziales Jahr beim Deutschen Roten Kreuz in Tübingen mit Absolvierung einer Ausbildung zur Rettungssanitäterin

Studium

10/2009 - 09/2011

Studium der Humanmedizin an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg

- Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: 07.09.2011

09/2011 - 09/2016

Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen

- Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: 16.04.2015
- Praktisches Jahr
 1. Tertial: Chirurgie am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart
 2. Tertial: Urologie an der Universitätsklinik Tübingen
 3. Tertial: Innere Medizin am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart
- Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: 30. und 31.05.2016

02/2013 - 10/2013

Wissenschaftliche Hilfskraft am fMEG-Zentrum (fetale Magnetoenzephalographie) der Universitätsfrauenklinik Tübingen

Berufstätigkeit ab
01.09.2016

Assistenzärztin in der Urologie, Universitätsklinik Tübingen

