Molekulare Mechanismen der Knochenmetastasierung des Nierenzellkarzinoms

Dissertation

zur Erlangung des Grades "Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Elke Schneider

geboren am 03.01.1984 in Wiesbaden

Mainz, im August 2012

Dekan:

- 1. Berichterstatterin:
- 2. Berichterstatter:

Tag der Mündlichen Prüfung: 28.11.2012

Es ist nicht der Berg, den wir bezwingen – wir bezwingen uns selbst (Sir Edmund Hillary).

Inhaltsverzeichnis

1.1 Einleitung	6
1.1 Das Nierenzellkarzinom	6
1.1.1 Epidemiologie	6
1.1.2 Histopathologische Einteilung und klinische Klassifikation	6
1.1.3 Pathologie	7
1.1.3.1 Genetische Ursachen	7
1.1.3.2 Symptome und Diagnose	8
1.1.4 Prognose	9
1.1.5 Therapie	10
1.1.5.1 Nephrektomie	10
1.1.5.2 Adjuvante Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms	11
1.1.5.3 Target-Therapie als adjuvante Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms	11
1.1.5.4 Weitere Therapieoptionen bei NZK-Metastasen	13
1.2 Metastasierung	13
1.2.1 Mechanismus der Metastasierung	14
1.2.2 Molekulare Hintergründe der Prozesse der NZK-Metastasierung	16
1.2.3 Organspezifische Metastasierung	20
1.2.3.1 Hypothesen zur Erklärung der organspezifischen Metastasierung	20
1.2.3.2 Hintergründe einer Knochen-spezifischen Metastasierung	21
1.3 Die Rolle des Calcium-sensitiven Rezeptors (CaSR) und Calciums bei der Knochen spezifischen Metastasierung	22
1.3.1 Calcium und CaSR	22
1.3.2 Calcium und CaSR bei der Knochenmetastasierung anderer Tumorentitäten	25
1.3.2.1 Calcium und CaSR als Induktoren der Knochenmetastasierung im Mamma- und Prostatakarzinom	25
1.3.2.2 Interaktionen zwischen Tumorzellen und Osteoklasten in der Knochenmatrix via Calcium und CaSR zur Anpassung des Metastasierungsortes	26
1.3.3 Calcium-Signalweiterleitung via CaSR	27
1.3.4 Regulation der Expression des CaSR	29
1.3.5 Allosterische Modulation des CaSR	29
1.4 Zielsetzung	30
2. Material und Methoden	32
2.1 Material	32
2.1.1 Chemikalien	32
2.1.2 Puffer und Lösungen	33
2.1.3 Kits	35

2.1.4 Antikörper	
2.1.4.1 Primärantikörper	
2.1.4.2 Sekundärantikörper	
2.1.5 Oligonukleotide	
2.1.6 Größen- und Molekulargewichtsstandards	
2.1.7 Verbrauchsmaterialien	
2.1.8 Gebrauchsmaterialien	
2.1.9 Geräte	
2.1.10 Verwendete Proben	
2.1.10.1 Gewebeproben	
2.1.10.2 Primäre Zellen	
2.1.10.3 Kontinuierliche Zelllinien	40
2.2 Methoden	41
2.2.1 Gewinnung von Proben aus NZK-Patientengewebe	41
2.2.2 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	
2.2.2.1 PCR (Polymerase-Kettenreaktion) zum Nachweis von <i>CaSR</i> cDNA	
in NZK-Gewebeproben	41
2.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung der PCR-Produkte	43
2.2.3 Quantitative Real-Time PCR zum Nachweis von CaSR cDNA in	
NZK-Gewebeproben	43
2.2.4 Arbeiten mit Zellen	45
2.2.4.1 Anlegen einer Primärzellkultur aus NZK-Patientengewebe	45
2.2.4.2 Kultivieren und Passagieren von Zellen	46
2.2.4.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	47
2.2.4.4 Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer	47
2.2.4.5 Behandlung der NZK-Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen	48
2.2.5 Immunzytochemische Färbung	48
2.2.5.1 Zytospin für immunzytochemische Färbung	49
2.2.5.2 Immunzytochemische Färbung zum Nachweis des epithelialen	
Ursprungs der primären NZK-Zellen	
2.2.6 Durchflusszytometrische Analyse des CaSR in primären NZK-Zellen	
2.2.7 Chemotaxis-Versuch in der Boyden Kammer	
2.2.7.1 Herstellung der Zellsuspension	
2.2.7.2 Ansetzen der Chemotaxine	
2.2.7.3 Durchführung des Chemotaxıs-Versuchs	
2.2.7.4 Reinigung der Boyden-Kammer	
2.2.8 Adhäsionsversuch	
2.2.8.1 Ansetzen der Extrazellularmatrix-Komponenten	
2.2.8.2 Durchtuhrung des Adhäsionsversuchs	
2.2.9 Analyse der Zellproliteration mittels BrdU (Bromdesoxyuridin)-Inkorporat	on56
2.2.10 Arbeiten mit Proteinen	57

2.2.10.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus NZK-Zellkulturen für Westernblot-Analysen	58
2.2.10.2 Herstellung von Gesamtproteinevtrakten aus NZK-Gewebe für	
Westernblot-Analysen	58
2.2.10.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	59
2.2.10.4 Fällung von Proteinen	59
2.2.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und	
Westernblot-Analyse von Gesamtproteinextrakten aus NZK-Zellkulturen	60
2.2.11.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	60
2.2.11.2 Westernblot-Analyse	61
2.2.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und	_
Westernblot-Analyse von Gesamtproteinextrakten aus NZK-Gewebe	63
2.2.12.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	63
2.2.12.2 Westernblot-Analyse	63
2.2.13 Phospho-Kinase Array	64
2.2.13.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus Zellkulturen für den Phospho-Kinase Array	64
2.2.13.2 Durchführung des Phospho-Kinase Arrays	65
2.2.14 Zytotoxizitätstests	65
2.2.14.1 Zytotoxizitätstest mit MTT	65
2.2.14.2 Zytotoxizitätstest mit Alamarblau	66
2.2.14.2 Priotallyiolatt Förbung	67
2.2.14.5 KIIstallylolett-Falbullg	07
3. Ergebnisse	67
3. Ergebnisse 3.1 Einfluss des Calcium-sensitiven Rezeptors und extrazellulären Calciums auf die	67
 3. Ergebnisse 3.1 Einfluss des Calcium-sensitiven Rezeptors und extrazellulären Calciums auf die organspezifische Metastasenbildung in Knochen 	69
 3. Ergebnisse 3.1 Einfluss des Calcium-sensitiven Rezeptors und extrazellulären Calciums auf die organspezifische Metastasenbildung in Knochen 3.1.1 Expression der <i>CaSR</i>-mRNA in Gewebeproben von NZK-Patienten 	67 69 69 70
 3. Ergebnisse 3.1 Einfluss des Calcium-sensitiven Rezeptors und extrazellulären Calciums auf die organspezifische Metastasenbildung in Knochen 3.1.1 Expression der <i>CaSR</i>-mRNA in Gewebeproben von NZK-Patienten	67 69 69 70 72
 3. Ergebnisse 3.1 Einfluss des Calcium-sensitiven Rezeptors und extrazellulären Calciums auf die organspezifische Metastasenbildung in Knochen 3.1.1 Expression der <i>CaSR</i>-mRNA in Gewebeproben von NZK-Patienten	69 69 70 72 73
 3. Ergebnisse 3.1 Einfluss des Calcium-sensitiven Rezeptors und extrazellulären Calciums auf die organspezifische Metastasenbildung in Knochen 3.1.1 Expression der <i>CaSR</i>-mRNA in Gewebeproben von NZK-Patienten	67 69 70 72 73 75
 3. Ergebnisse 3.1 Einfluss des Calcium-sensitiven Rezeptors und extrazellulären Calciums auf die organspezifische Metastasenbildung in Knochen 3.1.1 Expression der <i>CaSR</i>-mRNA in Gewebeproben von NZK-Patienten	67 69 70 72 73 75
 3. Ergebnisse 3.1 Einfluss des Calcium-sensitiven Rezeptors und extrazellulären Calciums auf die organspezifische Metastasenbildung in Knochen 3.1.1 Expression der <i>CaSR</i>-mRNA in Gewebeproben von NZK-Patienten 3.1.2 Expression des CaSR-Proteins in Gewebeproben von NZK-Patienten 3.1.3 Nachweis des epithelialen Ursprungs der primären NZK-Zellen 3.1.4 Expression des CaSR-Proteins in primären NZK-Zellen mit unterschiedlichemMetastasierungspotenzial 3.1.5 Untersuchung des Migrationsverhaltens primärer NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial ohne Einfluss von Calcium. 	67 69 70 72 73 75 77
 3. Ergebnisse 3.1 Einfluss des Calcium-sensitiven Rezeptors und extrazellulären Calciums auf die organspezifische Metastasenbildung in Knochen 3.1.1 Expression der <i>CaSR</i>-mRNA in Gewebeproben von NZK-Patienten 3.1.2 Expression des CaSR-Proteins in Gewebeproben von NZK-Patienten 3.1.3 Nachweis des epithelialen Ursprungs der primären NZK-Zellen 3.1.4 Expression des CaSR-Proteins in primären NZK-Zellen mit unterschiedlichemMetastasierungspotenzial 3.1.5 Untersuchung des Migrationsverhaltens primärer NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial ohne Einfluss von Calcium 3.1.6 Einfluss von extrazellulärem Calcium auf die Adhäsion primärer NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial 	67 69 70 72 73 75 75 77
 3. Ergebnisse 3.1 Einfluss des Calcium-sensitiven Rezeptors und extrazellulären Calciums auf die organspezifische Metastasenbildung in Knochen 3.1.1 Expression der <i>CaSR</i>-mRNA in Gewebeproben von NZK-Patienten 3.1.2 Expression des CaSR-Proteins in Gewebeproben von NZK-Patienten 3.1.3 Nachweis des epithelialen Ursprungs der primären NZK-Zellen 3.1.4 Expression des CaSR-Proteins in primären NZK-Zellen mit unterschiedlichemMetastasierungspotenzial 3.1.5 Untersuchung des Migrationsverhaltens primärer NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial ohne Einfluss von Calcium 3.1.6 Einfluss von extrazellulärem Calcium auf die Adhäsion primärer NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial 	67 69 70 72 73 75 75 77
 3. Ergebnisse 3.1 Einfluss des Calcium-sensitiven Rezeptors und extrazellulären Calciums auf die organspezifische Metastasenbildung in Knochen 3.1.1 Expression der <i>CaSR</i>-mRNA in Gewebeproben von NZK-Patienten 3.1.2 Expression des CaSR-Proteins in Gewebeproben von NZK-Patienten 3.1.3 Nachweis des epithelialen Ursprungs der primären NZK-Zellen 3.1.4 Expression des CaSR-Proteins in primären NZK-Zellen mit unterschiedlichemMetastasierungspotenzial 3.1.5 Untersuchung des Migrationsverhaltens primärer NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial ohne Einfluss von Calcium 3.1.6 Einfluss von extrazellulärem Calcium auf die Adhäsion primärer NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial 3.1.7 Einfluss von extrazellulärem Calcium auf das Migrationsverhalten primärer NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial 	67 69 70 72 73 75 75 77 78 80
 3. Ergebnisse 3.1 Einfluss des Calcium-sensitiven Rezeptors und extrazellulären Calciums auf die organspezifische Metastasenbildung in Knochen 3.1.1 Expression der <i>CaSR</i>-mRNA in Gewebeproben von NZK-Patienten 3.1.2 Expression des CaSR-Proteins in Gewebeproben von NZK-Patienten 3.1.3 Nachweis des epithelialen Ursprungs der primären NZK-Zellen 3.1.4 Expression des CaSR-Proteins in primären NZK-Zellen mit unterschiedlichemMetastasierungspotenzial 3.1.5 Untersuchung des Migrationsverhaltens primärer NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial ohne Einfluss von Calcium 3.1.6 Einfluss von extrazellulärem Calcium auf die Adhäsion primärer NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial 3.1.7 Einfluss von extrazellulärem Calcium auf das Migrationsverhalten primärer NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial 3.1.8 Einfluss von extrazellulärem Calcium auf das Proliferationsverhalten primärer NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial 	67 69 70 72 73 75 75 77 78 80 81
 3. Ergebnisse 3. 1 Einfluss des Calcium-sensitiven Rezeptors und extrazellulären Calciums auf die organspezifische Metastasenbildung in Knochen 3.1.1 Expression der <i>CaSR</i>-mRNA in Gewebeproben von NZK-Patienten 3.1.2 Expression des CaSR-Proteins in Gewebeproben von NZK-Patienten 3.1.3 Nachweis des epithelialen Ursprungs der primären NZK-Zellen	67 69 70 72 73 75 75 77 78 80 81 82
 3. Ergebnisse 3.1 Einfluss des Calcium-sensitiven Rezeptors und extrazellulären Calciums auf die organspezifische Metastasenbildung in Knochen 3.1.1 Expression der <i>CaSR</i>-mRNA in Gewebeproben von NZK-Patienten 3.1.2 Expression des CaSR-Proteins in Gewebeproben von NZK-Patienten 3.1.3 Nachweis des epithelialen Ursprungs der primären NZK-Zellen 3.1.4 Expression des CaSR-Proteins in primären NZK-Zellen mit unterschiedlichemMetastasierungspotenzial 3.1.5 Untersuchung des Migrationsverhaltens primärer NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial ohne Einfluss von Calcium 3.1.6 Einfluss von extrazellulärem Calcium auf die Adhäsion primärer NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial 3.1.7 Einfluss von extrazellulärem Calcium auf das Migrationsverhalten primärer NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial 3.1.8 Einfluss von extrazellulärem Calcium auf das Proliferationsverhalten primärer NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial 3.1.8 Einfluss von extrazellulärem Calcium auf das Proliferationsverhalten primärer NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial 3.1.9 Molekulare Hintergründe einer organspezifischen Metastasierung: Analyse der Signaltransduktionswege in primären NZK-Zellen mittels Kinase-Arra 	67 69 70 72 73 75 75 77 78 80 81 82
 3. Ergebnisse 3. Ergebnisse 3.1 Einfluss des Calcium-sensitiven Rezeptors und extrazellulären Calciums auf die organspezifische Metastasenbildung in Knochen 3.1.1 Expression der <i>CaSR</i>-mRNA in Gewebeproben von NZK-Patienten 3.1.2 Expression des CaSR-Proteins in Gewebeproben von NZK-Patienten 3.1.3 Nachweis des epithelialen Ursprungs der primären NZK-Zellen 3.1.4 Expression des CaSR-Proteins in primären NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial 3.1.5 Untersuchung des Migrationsverhaltens primärer NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial ohne Einfluss von Calcium 3.1.6 Einfluss von extrazellulärem Calcium auf die Adhäsion primärer NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial 3.1.7 Einfluss von extrazellulärem Calcium auf das Migrationsverhalten primärer NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial 3.1.8 Einfluss von extrazellulärem Calcium auf das Migrationsverhalten primärer NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial 3.1.9 Molekulare Hintergründe einer organspezifischen Metastasierung: Analyse der Signaltransduktionswege in primären NZK-Zellen mittels Westernblot 3.1.10 Molekulare Hintergründe einer organspezifischen Metastasierung: Analyse der Signaltransduktionswege in primären NZK-Zellen mittels Westernblot 	67 69 70 72 73 75 75 77 78 80 81 82 y87

3.2 Beurteilung der Bedeutung des Calcium-sensitiven Rezeptors für die organspezifische Metastasenbildung durch Einsatz eines CaSR-Inhibitors	1
3.2.1 Ermittlung einer geeigneten Konzentration des CaSR-Inhibitors NPS 2143 zur Behandlung der primären NZK-Zellen94	1
3.2.1.1 Zwei Zytotoxizitätstests im Vergleich: MTT und Alamarblau95	5
3.2.1.2 Ermittlung einer geeigneten Konzentration des CaSR-Inhibitors NPS 2143 mittels Zytotoxizitätstest mit MTT97	7
3.2.2 Migrationsverhalten primärer NZK-Zellen nach Behandlung mit dem CaSR-Inhibitor NPS 2143	•
3.2.3 Proliferationsverhalten primärer NZK-Zellen nach Behandlung mit dem CaSR-Inhibitor NPS 2143100)
3.2.4 Beteiligte Signaltransduktionswege in primären NZK-Zellen nach Behandlung mit dem CaSR-Inhibitor NPS 2143, analysiert mittels Westernblot102	2
3.3 Einfluss einer TKI-Therapie auf die organspezifische Metastasenbildung104	1
3.3.1 Überprüfung der erhaltenen Ergebnisse der primären NZK-Zellen an	
kontinuierlichen NZK-Zelllinien105	5
3.3.1.1 Expression des CaSR-Proteins in kontinuierlichen NZK-Zelllinien mit	
unterschiedlichem Metastasierungspotenzial105	5
3.3.1.2 Migrationsverhalten kontinuierlicher NZK-Zelllinien mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial	5
3.3.1.3 Einfluss von extrazellulärem Calcium auf das Proliferationsverhalten kontinuierlicher NZK-Zelllinien mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial 107	7
3.3.1.4 Beteiligte Signaltransduktionswege in kontinuierlichen NZK-Zelllinien mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial bestimmt mittels Westernblot 108	3
3.3.2 Einfluss einer TKI-Therapie auf das Verhalten kontinuierlicher NZK-Zelllinien mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial	1
3.3.2.1 Effekte einer TKI-Behandlung auf das Migrationsverhalten der NZK-Zelllinien	1
3.3.2.2 Effekte einer TKI-Behandlung auf das Proliferationsverhalten der	
NZK-Zelllinien113	3
4. Diskussion	5
4.1 Knochen-spezifische Metastasierung des NZK115	5
4.2 Extrazelluläres Calcium und der Calcium-sensitive Rezeptor begünstigen die NZK-Metastasierung in Knochen	5
4.2.1 Eine hohe Expression des CaSR korreliert mit der NZK-Metastasierung	
in Knochen115	5
4.2.2 Extrazelluläres Calcium ist kein Regulator der CaSR-Expression im NZK117	7
4.2.3 Calcium fördert die Migration und Proliferation von in Knochen metastasierenden NZK-Zellen via CaSR119	•
4.2.4 Über Aktivierung der dem CaSR nachgeschalteten Signalwege begünstigt Calcium die NZK-Knochenmetastasierung	3
4.2.4.1 Calcium aktiviert den Akt-Signalweg	3
1.2. The Calcium activity don take Signarweg	,

4.2.4.2 Calcium aktiviert die MAPK-Signalkaskade	125
4.2.4.3 Calcium aktiviert den PLCγ-1-Signalweg	127
4.2.4.4 Calcium reduziert die PTEN-Expression	128
4.2.5 Alternative, CaSR-unabhängige Wege bei der Calcium-Signalweiterleitung in NZK-Zellen	131
4.3 Bestimmte Charakteristika des NZK-Primärtumors begünstigen unabhängig von Calcium die Knochen-spezifische Metastasierung	133
4.3.1 Charakteristisches Metastasierungsverhalten: Eine erhöhte Migrations- und Adhäsionsfähigkeit von NZK-Zellen geht mit der Bildung von	100
Knochenmetastasen einher	133
4.3.2 Charakteristisches Expressionsmuster: Verschiedene Signalmolekule fördern die knochenspezifische Metastasierung von NZK-Zellen	136
4.3.2.1 Überexpression von α5-Integrinen	137
4.3.2.2 Starke Aktivität des FAK- und Akt-Signalwegs	138
4.3.2.3 Schwache PTEN-Expression	140
4.4 Metastasierungs-Charakteristika der primären NZK-Zellen lassen sich teilweise auf kontinuierliche NZK-Zelllinien übertragen	143
4.5 Die Effekte der Tyrosinkinaseinhibitoren auf unterschiedliche NZK-Zelllinien	
4.5 Die Effekte der Tyrosinkinaseinhibitoren auf unterschiedliche NZK-Zellinien sprechen für eine individualisierte Therapie des metastasierten NZK	147
 4.5 Die Effekte der Tyrosinkinaseinhibitoren auf unterschiedliche NZK-Zelllinien sprechen für eine individualisierte Therapie des metastasierten NZK 4.6 Ausblick	147 149
 4.5 Die Effekte der Tyrosinkinaseinhibitoren auf unterschiedliche NZK-Zelllinien sprechen für eine individualisierte Therapie des metastasierten NZK 4.6 Ausblick 5.1 Zusammenfassung 	147 149 152
 4.5 Die Effekte der Tyrosinkinaseinhibitoren auf unterschiedliche NZK-Zelllinien sprechen für eine individualisierte Therapie des metastasierten NZK 4.6 Ausblick 5.1 Zusammenfassung 5.2 Summary 	147 149 152 154
 4.5 Die Effekte der Tyrosinkinaseinhibitoren auf unterschiedliche NZK-Zelllinien sprechen für eine individualisierte Therapie des metastasierten NZK 4.6 Ausblick 5.1 Zusammenfassung 5.2 Summary 6. Literaturverzeichnis 	147 149 152 154 156
 4.5 Die Effekte der Tyrosinkinaseinhibitoren auf unterschiedliche NZK-Zelllinien sprechen für eine individualisierte Therapie des metastasierten NZK 4.6 Ausblick 5.1 Zusammenfassung 5.2 Summary 6. Literaturverzeichnis 7. Anhang 	147 149 152 154 156 173
 4.5 Die Effekte der Tyrosinkinaseinhibitoren auf unterschiedliche NZK-Zelllinien sprechen für eine individualisierte Therapie des metastasierten NZK 4.6 Ausblick 5.1 Zusammenfassung 5.2 Summary 6. Literaturverzeichnis 7. Anhang 7.1 Abkürzungsverzeichnis 	147 149 152 154 156 173 173
 4.5 Die Effekte der Tyrosinkinaseinhibitoren auf unterschiedliche NZK-Zellinien sprechen für eine individualisierte Therapie des metastasierten NZK 4.6 Ausblick 5.1 Zusammenfassung 5.2 Summary 6. Literaturverzeichnis 7. Anhang 7.1 Abkürzungsverzeichnis 7.2 Abbildungsverzeichnis 	147 149 152 154 156 173 173 176
 4.5 Die Effekte der Tyrosinkinaseinhibitoren auf unterschiedliche NZK-Zellinien sprechen für eine individualisierte Therapie des metastasierten NZK	147 149 152 154 156 173 173 176 179
4.5 Die Effekte der Tyrosinkinaseinhibitoren auf unterschiedliche NZK-Zelllinien sprechen für eine individualisierte Therapie des metastasierten NZK 4.6 Ausblick 5.1 Zusammenfassung 5.2 Summary 6. Literaturverzeichnis 7. Anhang 7.1 Abkürzungsverzeichnis 7.2 Abbildungsverzeichnis 7.3 Tabellenverzeichnis 7.4 Werte zu den Abbildungen	147 149 152 154 156 173 173 176 179
 4.5 Die Effekte der Tyrosinkinaseinhibitoren auf unterschiedliche NZK-Zelllinien sprechen für eine individualisierte Therapie des metastasierten NZK 4.6 Ausblick 5.1 Zusammenfassung 5.2 Summary 6. Literaturverzeichnis 7. Anhang 7.1 Abkürzungsverzeichnis 7.2 Abbildungsverzeichnis 7.3 Tabellenverzeichnis 7.4 Werte zu den Abbildungen 7.5 Lebenslauf 	147 149 152 154 156 173 173 173 176 179 179
4.5 Die Effekte der Tyrosinkinaseinhibitoren auf unterschiedliche NZK-Zellinien sprechen für eine individualisierte Therapie des metastasierten NZK 4.6 Ausblick 5.1 Zusammenfassung 5.2 Summary 6. Literaturverzeichnis 7. Anhang 7.1 Abkürzungsverzeichnis 7.2 Abbildungsverzeichnis 7.3 Tabellenverzeichnis 7.4 Werte zu den Abbildungen 7.5 Lebenslauf 7.6 Publikationen und Kongressbeiträge	147 149 152 154 156 173 173 176 179 179 185 185
4.5 Die Effekte der Tyrosinkinaseinhibitoren auf unterschiedliche NZK-Zellinien sprechen für eine individualisierte Therapie des metastasierten NZK 4.6 Ausblick 5.1 Zusammenfassung 5.2 Summary 6. Literaturverzeichnis 7. Anhang 7.1 Abkürzungsverzeichnis 7.2 Abbildungsverzeichnis 7.3 Tabellenverzeichnis 7.4 Werte zu den Abbildungen 7.5 Lebenslauf 7.6 Publikationen und Kongressbeiträge	147 149 152 154 156 173 173 173 176 179 179 185 185
4.5 Die Effekte der Tyrosinkinaseinhibitoren auf unterschiedliche NZK-Zelllinien sprechen für eine individualisierte Therapie des metastasierten NZK 4.6 Ausblick 5.1 Zusammenfassung 5.2 Summary 6. Literaturverzeichnis 7. Anhang 7.1 Abkürzungsverzeichnis 7.2 Abbildungsverzeichnis 7.3 Tabellenverzeichnis 7.4 Werte zu den Abbildungen 7.5 Lebenslauf 7.6 Publikationen und Kongressbeiträge 7.6.1 Originalpublikationen 7.6.2 Kongressebeiträge	147 149 152 154 156 173 173 176 179 179 185 185 185 185

1.1 Einleitung

1.1 Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Nierenzellkarzinom (NZK) macht etwa 3% aller Tumorerkrankungen aus und ist mit 90% die häufigste maligne Erkrankung der Niere. Die Inzidenz ist altersabhängig, erreicht ihren Höhepunkt im 6.-7. Lebensjahrzehnt und steigt jährlich um etwa 2% an. Pro Jahr treten in Deutschland 15.000 Neuerkrankungen auf (270.000 Fälle weltweit), wobei Männer 1,5- bis 3-mal so häufig erkranken wie Frauen (Foranara und Hoda, 2011; Ljungberg et al., 2011).

1.1.2 Histopathologische Einteilung und klinische Klassifikation



Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Nephron-/ Sammelrohrsystems, modifiziert nach Netter, 2008. Die einzelnen Subtypen des Nierenzellkarzinoms sind den entsprechenden Regionen dieses Systems zugeordnet, aus denen sie hervorgehen.

Das Nierenzellkarzinom lässt sich histopathologisch in vier verschiedene Subtypen unterteilen. Das klarzellige Nierenkarzinom ist mit 75-80% der häufigste Subtyp (Cairns, 2012). Es zeichnet sich durch Zellen aus, deren Zytoplasma nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung klar erscheint. Zudem sind feine Gefäßaufzweigungen typisch (Störkel, 1999). An nächster Stelle folgt das papilläre Nierenkarzinom mit 10-15% aller Fälle. Die beiden häufigsten Subtypen haben ihren Ursprung im Epithel des proximalen Tubulus (Abbildung 1). Seltener treten das chromophobe NZK (5%) und das Ductus-Bellini-Karzinom (Sammelrohrkarzinom; <1%) auf. Das chromophobe NZK entstammt dem distalen Tubulus, das Ductus-Bellini-Karzinom dem Sammelrohrsystem (Cairns, 2012). In 2% der Fälle ist das NZK nicht

klassifizierbar (Finley et al., 2011). Neben den malignen Veränderungen der Niere treten in 3-7% der Fälle auch benigne Veränderungen wie das Onkozytom auf, das seinen Ursprung ebenfalls im distalen Tubulus und im Sammelrohrsystem hat (Cairns, 2012).

Die Einteilung in die unterschiedlichen Subtypen erfolgt jedoch nicht nur nach histologischen Kriterien, sondern auch unter Einbezug genetischer Veränderungen, sogenannter Biomarker, die im nächsten Abschnitt näher beschrieben werden.

Die klinische Klassifikation erfolgt nach den internationalen Richtlinien der TNM-Klassifikation, die durch die UICC festgelegt wurden ("Union Internationale Contre le Cancer"). Hierbei werden die lokale Ausdehnung und Größe des Primärtumors ("T – Tumor"), der Befall regionaler Lymphknoten ("N – Nodes") und das Vorhandensein von Fernmetastasen ("M – Metastasen") beschrieben (Haferkamp et al. 2006).

1.1.3 Pathologie

Zu den bisher bekannten Risikofaktoren, die eine NZK-Erkrankung begünstigen, zählen Rauchen, Übergewicht, chronische Niereninsuffizienz (mit Langzeitdialyse), arterielle Hypertonie und ihre Therapie. Ebenso erhöhen genetische Syndrome wie das Von-Hippel-Lindau (VHL)-Syndrom, das Birt-Hogg-Dubé-Syndrom und die tuberöse Sklerose das Erkrankungsrisiko (Cohen und McGovern, 2005; Ljungberg et al., 2011). In Bezug auf die genetischen Risikofaktoren stellt das VHL-Syndrom den größten hereditären Risikofaktor dar (Gnarra, 1994). In nahezu 100% der hereditären NZK-Erkrankungen liegt eine Mutation des auf Chromosom 3p²⁵⁻²⁶ lokalisierten VHL-Gens vor. Die hereditäre Form des NZK ist nur in etwa 2% der Fälle vertreten. Die sporadische Form macht den weitaus größeren Teil der Erkrankungen aus. Eine Mutation des VHL-Gens ist mit 60-80% in der sporadischen Form des klarzelligen NZK ebenfalls weit verbreitet (Clifford et al., 1998; Buentig et al., 2002, Finley et al., 2011).

1.1.3.1 Genetische Ursachen

Die Entstehung eines Primärtumors vollzieht sich in den verschiedenen Tumorentitäten nach einem allgemeinen Schema. Der erste Schritt der Kanzerogenese wird durch genetische Veränderungen induziert. Hierzu zählen unter anderem Genmutationen, Chromosomdeletionen oder Promotorhypermethylierung. Die hieraus resultierende genomische Instabilität kann zur Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen. Signaltransduktionswege unterliegen schließlich nicht mehr der normalen Regulation. Zellen, in denen es zu diesen ersten Veränderungen kommt, bilden sich als prä-maligne Zellen heraus. Sie zeichnen sich im weiteren Verlauf durch unkontrolliertes Zellwachstum, Vermeidung von Apoptose, verstärkte Angiogenese und ein erhöhtes Metastasierungspotenzial aus (Hanahan und Weinberg, 2000; Banumathy und Cairns, 2010; Hanahan und Weinberg, 2011).

Wie bereits erwähnt, ist die Inaktivierung des VHL-Gens die häufigste genetische Veränderung im Vorfeld der Progression des klarzelligen NZK. In normalen Zellen wirkt das VHL-Gen als ein Tumorsuppressorgen. Das Genprodukt von VHL reguliert den proteasomalen Abbau der HIF (Hypoxia-inducible transcription factors)-Proteine. Eine Inaktivierung des VHL-Gens, wie es im klarzelligen NZK meistens der Fall ist, führt nun zur Akkumulation der HIF-Proteine. Diese können schließlich die Transkription ihrer Zielgene verstärken (Rathmell und Chen, 2008). Zu diesen Genen gehören unter anderem die Gene für VEGF (Vascular endothelial growth factor), PDGF (Platelet-derived growth factor) und EGF (Epidermal growth factor). Die Produkte dieser Gene sind essentiell für die Bildung neuer Blutgefäße im Rahmen der Angiogenese, die unerlässlich für ein weiteres Tumorwachstum ist (Arjumand und Sultana, 2012). Im klarzelligen NZK kommt es neben der Inaktivierung des VHL-Gens zur Expressionsreduktion eines weiteren Tumorsuppressorsgens. Bei diesem handelt es sich um das Gen für PTEN (Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10). In normalen Zellen hemmt PTEN die Tumorprogression und Metastasierung durch eine negative Regulation von Zellproliferation und Zellmigration und Initiierung von Apoptose. Ein Fehlen des Tumorsuppressors begünstigt somit die Kanzerogenese des klarzelligen NZK (Hager et al., 2007, Brenner et al., 2002).

Über das VHL-Gen hinaus gibt es 51 weitere potenzielle Biomarker, die in der aktuellen Forschung betrachtet werden und ein NZK klassifizieren könnten. Es bedarf jedoch noch einer Validierung mit größerer Probenanzahl, um diese Biomarker routinemäßig einsetzen zu können (Oosterwijk, 2011).

1.1.3.2 Symptome und Diagnose

Bei der Mehrzahl der NZK-Patienten verläuft die Erkrankung lange symptomarm. Aus diesem Grund wird das NZK meistens zufällig im Rahmen einer routinemäßigen Ultraschalluntersuchung der Niere diagnostiziert. Die weitere Differenzierung zwischen

benigner Raumforderung und malignem Tumor, eine nähere Klassifizierung und der Nachweis von Fernmetastasen erfolgt schließlich durch weiterführende Bildgebung mittels Computertomographie oder Magnetresonanztherapie (Haferkamp, 2006). Sind zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Metastasen vorhanden, kommt es bei diesen Patienten zum Teil zur Ausprägung deutlicher Symptome. Knochenmetastasen verursachen Osteolyse, die mit Knochenschmerzen, Frakturen, Hypercalcämie und Kompressionen des Rückenmarks und anderer Nerven einhergehen (Roodman, 2004; Zekri, 2001). Lungenmetastasen können sich durch Hustenattacken, Bluthusten, Bronchitis und Schmerzen im Brustbereich bemerkbar machen (www.uniklinik-freiburg.de; www.radiologie-uni-frankfurt.de).

1.1.4 Prognose

Zur Erstellung einer Prognose für NZK-Patienten dienen unterschiedliche Faktoren, die Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben. Zu den gängigsten Prognosefaktoren gehören die TNM-Klassifikation und der pathologische Subtyp (Uygur, 1999). In Zukunft sollen diese Faktoren jedoch durch neu identifizierte, immunhistochemisch nachweisbare, prognostische Marker ergänzt werden. Hierbei haben sich die Carboanhydrase IX (nachweisbar in 94% aller klarzelligen NZK; niedriges Level ist mit schlechter Prognose assoziiert), VEGF (erhöhtes Serumlevel ist mit kürzerem Überleben assoziiert), HIF 1 α (besonders stark exprimiert in klarzelligen NZK; Überexpression ist mit kürzerem Überleben assoziiert) und Survivin (schlechte Prognose bei Überexpression) als erfolgsversprechend herausgestellt. Wie auch schon für die Biomarker angemerkt wurde, bedarf es auch in Bezug auf die prognostischen Marker weiterer Validierung (Finley, 2011).

Ist das NZK lokal begrenzt, kann die Mehrheit der Patienten mit einer guten Prognose rechnen. Nach Nephrektomie liegt die 5-Jahres-Überlebensrate in Deutschland zwischen 65-75% in Abhängigkeit der Größe, Ausdehnung (= "T"-Stadium) und des histologischen Subtyps des Primärtumors (Fornara und Hoda, 2011). Auf Grund der ausbleibenden Symptome in den frühen Erkrankungsstadien wird das NZK häufig erst entdeckt, wenn die Erkrankung bereits fortgeschritten ist und Metastasen vorhanden sind. In diesem Erkrankungsstadium verschlechtert sich die Prognose erheblich, was vor allem darauf zurückzuführen ist, dass die Metastasen resistent gegenüber den gängigen Therapieformen wie Chemo- und Radiotherapie sind (Jung et al, 2003). Etwa 20-50% der NZK-Patienten (abhängig vom "T"-Stadium) entwickeln im Laufe ihrer Erkrankung Fernmetastasen. Hierbei sind meistens mehrere Organe gleichzeitig betroffen, wobei Lungen, Knochen, Leber, Gehirn

und Lymphknoten die stärkste Frequenz aufweisen (Abbildung 1.2). Bei Patienten mit metastasiertem NZK liegt das mediane Überleben bei lediglich 6-12 Monaten (Flanigan et al., 2003). Sind die regionalen Lymphknoten befallen, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate unter 20%; kommt es zur Ausbildung von Fernmetastasen liegt sie unter 10% (Oberneder et al., 1997; Cairns, 2012). Eine besonders aggressive Form der Fernmetastasen sind Knochenmetastasen, zu deren Ausprägung es in etwa 30% der NZK-Fälle kommt. Das mediane Überleben liegt ab dem Zeitpunkt der Diagnose bei 10,6 Monaten (Woodward et al., 2011).



Abbildung 1.2: Die Hauptmetastasierungsorte des NZK: Lungen, Knochen, Leber, Gehirn und Lymph-knoten, modifiziert nach Netter, 2008.

1.1.5 Therapie

1.1.5.1 Nephrektomie

Als konventionelle Therapie und teilweise auch einzig kurative Option wird bei NZK-Patienten die Nephrektomie angewandt. Hierbei wird die radikale Nephrektomie immer mehr von der Teilresektion des Tumors als organerhaltende Maßnahme verdrängt. Liegt ein lokal begrenzter Tumor in frühem Stadium vor, der eine gewisse Größe (ca. 4cm) nicht überschreitet, kann die Nephrektomie laparoskopisch durchgeführt werden (Linehan und Zbar, 2004; Haferkamp et al., 2006).

1.1.5.2 Adjuvante Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms

Auf Grund seines aggressiven Charakters, begründet in der Eigenschaft schnell zu metastasieren, ist eine Nephrektomie oft nicht ausreichend. Liegen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Metastasen vor, dient die Nephrektomie häufig nur als palliative Maßnahme zur lokalen Symptomkontrolle. In den meisten Fällen müssen sich die Patienten zusätzlich einer adjuvanten Therapie unterziehen. Die Festlegung einer erfolgreichen Therapie erweist sich jedoch als schwierig, da die Metastasen häufig gegenüber den gängigen Therapieformen wie Chemo-, Strahlen- und Hormontherapie resistent sind. Die Ansprechrate einer Immuntherapie mit Zytokinen (Interferon- α oder Interleukin-2 oder deren Kombination) liegt unter 10% und geht auf Grund starker Nebenwirkungen mit einem erheblichen Verlust an Lebensqualität einher (Oberneder et al., 1997; Bleumer et al., 2003).

1.1.5.3 Target-Therapie als adjuvante Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms

Auf Grund der Fortschritte in der aktuellen Forschung können die molekularen Hintergründe der Tumorprogression und der Metastasenbildung immer weiter aufgeklärt werden. Es konnten bereits einige wichtige Signalwege und ihre Komponenten identifiziert werden, die für diese Prozesse von essentieller Bedeutung sind. Basierend auf diesen Kenntnissen wurden einzelne Moleküle als Zielstrukturen für neue Medikamente ausgewählt, die im Rahmen der sogenannten Target-Therapie bereits in der Klinik zum Einsatz kommen.

Die Grundlage hierfür bildet die Kenntnis der VHL-Mutation im klarzelligen NZK, die damit verbundene verstärkte Expression von VEGF und PDGF und die Aktivierung der entsprechenden Rezeptoren (VEGF-Rezeptor, PDGF-Rezeptor) (Arjumand und Sultana, 2012). Diese Rezeptortyrosinkinasen (RTK) bilden die Angriffspunkte für die drei zugelassenen Multikinaseinhibitoren Sunitinib, Sorafenib und Pazopanib weshalb sie auch als Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) bezeichnet werden (Abbildung 1.3). Die TKI sorgen für eine Hemmung der Kinase-Domänen der Rezeptoren und der nachgeschalteten intrazellulären Signalwege. Somit können tumorfördernde Prozesse wie Angiogenese, Proliferation und Migration inhibiert werden (Hiles und Kolesar, 2008; Pick und Nystrom, 2012). Sunitinib kommt als Erstlinien-Therapeutikum am häufigsten zum Einsatz, wird aber auch für die Zweitlinientherapie verwendet. Als Standard für die Zweitlinientherapie ist jedoch Sorafenib zugelassen. Zusätzlich zu den Wachstumsfaktorrezeptoren hemmt Sorafenib die Proteinkinase Raf (*rapidly accelerated fibrosarcoma*). Als weiterer Wirkstoff kommt der VEGF-Antikörper

Bevacizumab in der Erstlinientherapie zum Einsatz. In Kombination mit Interferon- α wird er alternativ zu Sunitinib eingesetzt (Miller, 2010).



Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Wirkmechanismen der Target-Therapeutika, modifiziert nach Lorenzo et al., 2009. Die Abbildung zeigt die Zielstrukturen der Target-Therapeutika, die zelluläre Lokalisation und Auswirkungen.

Tabelle 1.1: Empfehlungen zur medikamentösen Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms modifiziert nach Miller, 2010. Dieses Behandlungsschema entspricht den Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft.

	Progressionsgruppe	Therapie 1. Wahl	Alternative Therapie
Erstlinien-	niedriges und mittleres Risiko	Sunitinib	Interferon α + Bevacizumab
Therapie	hohes Risiko	Temsirolimus	Sunitinib
Zweitlinien-	Zytokin-Vortherapie	Sorafenib	Sunitinib
Therapie	Anti-VEGF-Vortherapie	Everolimus	Sorafenib

Um direkt in die verstärkte Expression von VEGF und PDGF eingreifen zu können, stehen die mTOR (*mammalian target of rapamycin*)-Inhibitoren Temsirolimus und Everolimus zur Verfügung. Durch die Inhibition des in Tumoren häufig verstärkt aktivierten mTOR-Signalwegs kommt es zur Unterbindung der positiven HIF-Regulation und der damit verbundenen Expressionsförderung von VEGF und PDGF (Pantuck et al., 2007). Temsirolimus wird als Erstlinien-Therapeutikum bei NZK-Patienten mit hohem Progressionsrisiko eingesetzt, Everolimus ausschließlich für die Zweitlinien-Therapie (Miller, 2010). Tabelle 1.1 zeigt eine Zusammenfassung der Therapie-Leitlinien für das metastasierte NZK.

Obwohl die Forschung auf dem Gebiet der Target-Therapie in den letzten Jahren enorme Fortschritte gemacht hat, muss noch vieles in klinischen Studien überprüft werden. Es sind nicht alle Zielstrukturen der bereits zugelassenen Medikamente identifiziert. Somit liegt das vollständige Ausmaß der Wirkweise noch im Dunkeln. Zudem sind die Therapien teilweise an niedrige Remissionsraten und enorme Nebenwirkungen gekoppelt, welche dringend reduziert werden müssten. Es bedarf also noch vieler Untersuchungen und mehr Rücksichtnahme auf patientenspezifische Unterschiede um dem Ziel einer individualisierten Therapie näher zu kommen (Oosterwijk et al., 2011).

1.1.5.4 Weitere Therapieoptionen bei NZK-Metastasen

Neben der Target-Therapie besteht die palliative Möglichkeit der Metastasektomie. Dies bietet sich vor allem an, wenn einzelne Metastasen vorliegen. Hierbei zeigt die Entfernung von Lungenmetastasen größere Erfolge als die Entfernung von Metastasen anderer Organe (Assouad et al., 2007). Liegen in einem Organ zu viele Metastasen vor oder kommt es zur Metastasierung in unterschiedliche Organe, führt ein chirurgischer Eingriff nicht unbedingt zu einer Verbesserung des Zustands des Patienten. Bei Knochenmetastasen wird ein chirurgischer Eingriff durchgeführt, um die Knochen zu stabilisieren und einem Bruch vorzubeugen (Swanson, 2004). Dies kann nur durchgeführt werden, wenn der Zustand des Patienten nicht zu kritisch ist und mit einer positiven Auswirkung auf das Gesamtüberleben zu rechnen ist (Fottner et al., 2010). Eine weitere Möglichkeit bietet die Therapie mit Bisphosphonaten (Zoledronsäure), die den Knochenabbau reduzieren und die Schmerzen lindern (Smith, 2005). Hierbei handelt es sich jedoch lediglich um palliative Maßnahmen, die Möglichkeit einer kurativen Therapie besteht nicht.

1.2 Metastasierung

Für mehr als 90% der Krebstoten ist nicht der Primärtumor sondern die Metastasierung verantwortlich. Ein Vorhandensein von Metastasen erschwert die Behandlung von Patienten mit jeglichen Tumorerkrankungen. Auf Grund dieser Tatsachen sollte in der vorliegenden Arbeit besonders auf den Aspekt der Metastasierung eingegangen werden.

Die Bildung von Metastasen aus einem Primärtumor vollzieht sich in mehreren komplexen Schritten. Die einzelnen Mechanismen sind im Allgemeinen auf alle Tumorentitäten übertragbar. Im nächsten Abschnitt werden diese Mechanismen vom Loslösen der metastasierenden Tumorzellen aus dem Primärtumor bis zur Bildung von Metastasen in anderen Organen des Körpers im Detail beschrieben.

1.2.1 Mechanismus der Metastasierung

Die Bildung von Metastasen lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen: Intravasation und Extravasation (Abbildung 1.4). Im Vorfeld der Intravasation steht die Angiogenese des Primärtumors. Erreicht der Tumor eine gewisse Größe, benötigt er eine eigene Blutversorgung durch ausreichende Vaskularisierung. Die Blutgefäße bieten einen Austrittsort für Tumorzellen aus dem Primärtumor und eine Möglichkeit, im Körper bis zu einem sekundären Organ verteilt zu werden (Bashyam, 2002; Mareel und Leroy, 2002). Da Tumorzellen die Eigenschaft besitzen, weniger stark adhärent zu sein, können sie sich leichter aus Zellverbänden und von Komponenten der Extrazellularmatrix (EZM) lösen als gesunde Zellen und aus dem Primärtumor austreten (Oppenheimer, 2006). Bevor die Tumorzellen ein Blutgefäß erreichen, müssen sie die Basallamina durchdringen. Durch die Sekretion von Proteasen, die für die Degradation der EZM-Komponenten verantwortlich sind, wird dieser invasive Schritt erleichtert (Mc Cawley und Matrisian, 2000). Nach Migration durch das angrenzende Stroma und das Endothel gelangen die Tumorzellen in das Blutgefäßsystem und es kommt zum erfolgreichen Abschluss des Prozesses der Intravasation. So lange es nicht zur Extravasation kommt, also das Austreten der Tumorzellen aus dem Blutkreislauf, sind die Zellen dem Immunsystem ausgesetzt. Zudem wirken die Scherkräfte des Blutflusses auf die Zellen. Diesen Zustand überlebt nur etwa 1% der Tumorzellen (Oppenheimer, 2006). Die überlebenden Tumorzellen zirkulieren mit dem Kreislaufsystem, bis es zu einem Zirkulationsstopp im Kapillarbett eines Sekundärorgans kommt (Chambers et al., 2002).

Der Zirkulationsstopp kann durch verschiedene Mechanismen eingeläutet werden. Die Tumorzellen können auf Grund des begrenzten Durchmessers der kleinen Kapillaren "stecken bleiben" (Chambers et al., 2002). Dies kann dadurch begünstigt werden, dass die Tumorzellen Zellcluster bilden oder von Thrombozyten umgeben werden und sie somit eine größere Masse bilden. Hierdurch werden die Endothelzellen zur Seite gedrängt (Weinberg, 2007). Eine weitere Möglichkeit besteht im sogenannten "Rollen am Endothel" wie es auch bei Leukozyten der Fall ist, die an den Entzündungsort gelangen müssen (Kubes und Kerfoot, 2001; Geng et al., 2012). Auf diese Weise können Tumorzellen an Selektine der Endothelzellen binden, was zu einer Verlangsamung ihrer Fortbewegung führt. Die Bindung wird schließlich durch weitere Zelladhäsionsmoleküle, den Integrinen, verstärkt und die Zelle

wird gestoppt. Die Endothelzellen weichen an der entsprechenden Stelle zur Seite und bilden eine Lücke für die eindringenden Zellen (Strell und Entschladen, 2008; Miles et al., 2008).



Abbildung 1.4:

Darstellung der einzelnen Schritte im Prozess der Metastasierung, Lunge und Niere aus Netter, 2008. Die Abbildung zeigt den Weg der metastasierenden Tumorzellen aus dem Primärtumor der Niere durch den Blutkreislauf bis in sekundäre Organe, wie Lungen und Knochen, in denen es zur Bildung von Metastasen kommt.

Die nun zugängliche Basallamina wird wiederum durch Proteasen degradiert (Morgan-Parkes, 1995). Mit dem Eindringen der Tumorzellen in das subendotheliale Gewebe des Sekundärorgans wird der Prozess der Extravasation beendet. Im Zielorgan angekommen, beginnen die Tumorzellen – wenn sie entsprechende Bedingungen vorfinden – zu proliferieren und es kommt zur Bildung einer Fernmetastase (Bashyam, 2002).

Da die Tumorzellen im permanenten Austausch mit ihrer Umgebung stehen, können sie Zellen in ihrer Umgebung dazu stimulieren, das Milieu für sie anzupassen. So können sie zum Beispiel Fibroblasten dazu anregen, Fibronektin zu produzieren und zu sezernieren, was ihnen die Adhäsion und Proliferation erleichtert. Andere Zellen werden zur Produktion von Angiogenese- und anderen Wachstumsfaktoren angeregt, die ebenfalls die Vermehrung der Tumorzellen fördern (Kaplan et al., 2005; Oppenheimer, 2006). Eine andere Hypothese

besagt, dass die sogenannte prä-metastatische Nische schon vor dem Eindringen der Tumorzellen auf deren Bedürfnisse hin angepasst wird. Hierfür sorgen Signale, die vom Primärtumor ausgehen. Die prä-metastatische Nische wird in diesem Fall unter anderem durch ein verstärktes Vorhandensein von Fibronektin und Proteasen so verändert, dass die Invasion der Tumorzellen begünstigt werden kann (Valastyan und Weinberg, 2011).

Der erfolgreiche Prozess der Metastasierung wird hauptsächlich durch die folgenden zellulären Mechanismen bestimmt: Migration, Adhäsion, Proliferation und Apoptose. Im nächsten Abschnitt sollen daher die zellulären Signalwege, die diese Prozesse regulieren erklärt werden. Zudem soll auf Fehlregulationen im NZK hingewiesen werden, die diese Prozesse und somit die Metastasierung begünstigen.

1.2.2 Molekulare Hintergründe der Prozesse der NZK-Metastasierung

Der Prozess der Metastasierung beruht hauptsächlich auf der Fähigkeit der Tumorzellen zur gesteigerten Migration, Adhäsion, Proliferation und zur Umgehung des programmierten Zelltods. Um diese Fähigkeiten auszuüben, ist eine Expression von Integrinen für die Zellen unerlässlich. Integrine sind transmembrane Zelladhäsionsproteine, die eine Kontaktstelle zwischen EZM, dem Zytoskelett und intrazellulären Signalwegen bilden. Diese Zell-Matrix-Verbindungen werden als Fokalkontakte bezeichnet. Ein aktives Integrin-Heterodimer setzt sich aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammen. So bindet zum Beispiel ein α 5 β 1-Heterodimer an die EZM-Komponente Fibronektin (Brakebusch und Fässler, 2005). Der Kontakt einer Zelle zur EZM beeinflusst Proliferation und Apoptose. Zudem kommt es nach der Bildung von Fokalkontakten zu Veränderung in der Organisation des Zytoskeletts und der damit verbundenen Zellform. Dies ist nötig für eine gerichtete Motilität, die schließlich zur Fortbewegung der Zelle führt (Flier und Sonnenberg, 2001). In Bezug auf die Metastasierung konnte bereits festgestellt werden, dass das Metastasierungspotenzial von Tumorzellen mit der Intensität der Integrinexpression korreliert. Arbodela et al. zeigten dies für die Expression von β 1-Integrinen in Mammakarzinom- und Ovarialkarzinomzellen (Arbodela et al., 2003). Für das NZK wurde eine Überexpression der αv-Untereinheit nachgewiesen (Korhonen et al., 1992). Des Weiteren traten Veränderungen in der Expression der α 5- und der α 2-Untereinheit auf (Terpe et al., 1993; Spangenberg et al., 2006). Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) bieten Zellen eine weitere Möglichkeit um Kontakt mit dem extrazellulären Raum aufzunehmen. RTK sind transmembrane Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität. Extrazelluläre Ligandenbindung ist stets mit der Aktivierung der intrazellulär lokalisierten

Tyrosinkinase verbunden. Hierdurch wird ein Signal erzeugt, das von nachgeschalteten Molekülen erkannt und weitergeleitet wird, bis es schließlich eine zelluläre Antwort hervorruft. Zur Klasse der RTK zählen die Rezeptoren für PDGF, VEGF, EGF, TGF- β , IGF und FGF (Krauss, 2003). Im NZK und anderen Tumorentitäten liegen häufig Veränderungen in der Expression dieser Rezeptoren und ihrer Liganden vor. Wie bereits in Abschnitt 1.1.3.2 erwähnt, kommt es im klarzelligen NZK auf Grund der VHL-Mutation zu einer verstärkten Expression von VEGF und PDGF und damit zur erhöhten Aktivität der RTK (Arjumand und Sultana, 2012). Für das NZK wurde auch eine Überexpression der Rezeptoren für EGF und von TGF-β beschrieben (Paule und Brione, 2003; Yang et al., 2010).

Über die Aktivierung der Integrine und Rezeptor-Tyrosinkinasen durch Komponenten der EZM bzw. ihrer Liganden kommt es zu einer Signalweiterleitung in der Zelle, die in Tumorzellen verstärkt vorliegt. Hier gibt es verschiedene intrazelluläre Signalwege, die sich aus vielen Molekülen zu komplexen Transduktionskaskaden zusammensetzen.



Abbildung 1.5:

Schematische Darstellung der molekularen Prozesse, die zur Regulation der Metastasierung von Tumorzellen beitragen. Die Zelle hat, neben anderen, folgende zwei Möglichkeiten Kontakt mit ihrer Umgebung aufzunehmen: über Integrine und Rezeptor-Tyrosinkinasen. Beide Moleküle reagieren auf extrazelluläre Veränderungen mit der Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden, die in die Regulation verschiedener zellulärer Prozesse münden (Migration, Adhäsion, Proliferation, Apoptose).

Das von Integrinen weitergeleitete Signal wird zunächst auf FAK (Fokale Adhäsionskinase) und Shc (*Src homology 2 domain containing-Protein*) übertragen (Abbildung 1.5) (Krauss, 2003). Beide Proteine werden auf Grund einer Konformationsänderung der Integrine an diese rekrutiert und hier durch Phosphorylierung aktiviert. Im Anschluss kommt es über die Aktivierung der Kinase Raf zur Initiierung der MAPK (*Mitogen activated protein kinase*)-Signalkaskade. Hierbei sind die drei Haupt-Signalwege der Erk (*Extracellular signalregulated kinase*)-, der JNK (c-Jun NH₂-terminale Kinase)- und der p38-Signalweg. Sie führen zur Aktivierung weiterer Kinasen und Transkriptionsfaktoren, die schließlich die Transkription von Genen regulieren, die Proliferation fördern und Apoptose verhindern. Der MAPK-Signalweg kann zusätzlich über die Aktivität von RTK eingeleitet werden, da Shc auch diesen Rezeptoren nachgeschaltet ist (Krauss, 2003; Tamura et al., 1999; Pelicci 1992).





Über Aktivierung von p130^{Cas} (*p130 Crk-associated substrate*) fördert FAK zudem die Zellmotilität und -adhäsion führt. p130^{Cas} aktiviert Rho-GTPasen, die daraufhin mit WAS (Wiskott-Aldrich Syndrom)-Proteinen interagieren und den Arp2/3 (*Actin related proteins 2/3*)-Komplex aktivieren (Abbildung 1.6) (Yamazaki et al., 2005; Miki und Takenawa, 2003). Der Arp2/3-Komplex initiiert die Umstrukturierung des Zytoskeletts durch Polymerisation von Aktin-Monomeren zu Aktinfilamenten in Richtung des eintreffenden Signals an der

Zellmembran (Yamada und Araki, 2001). Die Zelle verändert auf die Weise ihre Form und bewegt sich hinzu der höheren Konzentration an Komponenten der EZM oder anderer chemotaktischer Faktoren (Miki und Takenawa, 2003; Krauss, 2003). Zusätzlich kommt es zur Ausbildung neuer Fokalkontakte. Diese Mechanismen sind essentiell für die koordinierte und gerichtete Migration und Adhäsion von Zellen (Gu et al., 1999).

Werden Rezeptor-Tyrosinkinasen durch Ligandenbindung aktiviert, wird die PI3 (Phosphatidyl-Inositol 3)-Kinase an die Phosphorylierungsstellen des Rezeptors rekrutiert und aktiviert (Abbildung 1.5). Sie ist nun in der Lage das Lipid PIP2 (Phosphatidyl-Inositol-(4,5)-Biphosphat) zu PIP3 (Phosphatidyl-Inositol-(3,4,5)-Triphosphat) zu phosphorylieren. Eine erhöhte PIP3-Akkumulation sorgt für die Rekrutierung von Akt/PKB (Proteinkinase B), die mit deren Aktivierung einhergeht (Hers et al., 2011). Akt wirkt nun auf viele Zielproteine ein (Bellacosa et al., 2004). Zum einen aktiviert es Rho-GTPasen, die die bereits für die FAK-Signalweiterleitung beschriebene Umstrukturierung des Zytoskeletts und Neubildung von Fokalkontakten initiieren (Abbildung 1.6). Über den mTOR-Komplex 1 und weitere Transkriptionsfaktoren reguliert Akt zum anderen die Transkription von anti-apoptotischen und pro-proliferativen Genen (Cully et al., 2006; Shaw und Cantley, 2006). Die von Integrinen und von RTK initiierten Signalwege stehen über FAK und PI3K miteinander in Verbindung. So kann der Akt-Signalweg auch durch Integrinaktivierung via FAK reguliert werden (Yamada und Araki, 2001).

Der Tumorsuppressor PTEN wirkt als Antagonist der beiden Signaltransduktionskaskasden ein. FAK und Shc werden durch Dephosphorylierung inaktiviert und somit wird die Signalweiterleitung zum MAPK-Signalweg unterbunden. Der Akt-Signalweg wird gehemmt, da durch Dephosphorylierung von PIP3 zu PIP2 durch PTEN nicht mehr genügend PIP3 zu Rekrutierung von Akt vorhanden ist. So wirkt PTEN den Prozessen, die zur Bildung von Metastasen führen, entgegen (Yamada und Araki, 2001). Für den proteasomalen Abbau von PTEN sorgt die Ubiquitinligase Nedd4.1 (Wang et al., 2007). Im NZK kommt es jedoch häufig zu einer Reduktion der Expression des Tumorsuppressors PTEN (Brenner et al., 2002; Hager et al., 2007). Hier findet also kein inhibitorischer Einfluss auf die Prozesse der Metastasierung statt.

1.2.3 Organspezifische Metastasierung

Die verschiedenen Tumorentitäten weisen sich durch für sie typische Orte der Metastasierung aus. So werden zum Beispiel bei einer NZK-Erkrankung bevorzugt Lungen, Knochen, Leber und Gehirn befallen (Han et al., 2003). Obwohl bereits viel über die Mechanismen der Bildung von Metastasen bekannt ist, sind die Hintergründe für diese Organspezifität der Tumorzellen noch relativ unklar. In den letzten Jahrzehnten der Forschung haben sich verschiedene mögliche Hypothesen heraus kristallisiert, die die Festlegung bestimmter Organe als bevorzugte Metastasierungsorte erklären könnten.

1.2.3.1 Hypothesen zur Erklärung der organspezifischen Metastasierung

Die erste Hypothese besagt, dass die Spezifität in engem Zusammenhang mit dem Kreislaufsystem steht. Hierbei geht die Auswahl der Metastasierungsorte einher mit dem Verlauf des Blutkreislaufs durch den Körper, die Höhe des Blutdrucks, die Stärke des Blutflusses und mit dem Lumen und der Durchlässigkeit der Blutgefäße. So metastasieren Tumorzellen zum Beispiel bevorzugt in Organe, durch die sie der Blutfluss unmittelbar nach Verlassen des Primärtumors führt (Chambers et al., 2002). In der zweiten Hypothese werden verschiedene genetische und epigenetische Charakteristika der metastasierenden Tumorzellen als ausschlaggebend für deren organspezifische Ausbreitung diskutiert. Hierbei geht es um genetische Veränderungen, die das Überleben der Tumorzellen und die Fähigkeit zur Metastasierung in ganz bestimmten Organen begünstigen. Die Veränderungen treten häufig schon früh in der Kanzerogenese auf und betreffen intrazelluläre und sekretorische Eigenschaften sowie die Beschaffenheit der Zelloberfläche (Nguyen et al., 2009; Psaila und Lyden, 2009). Die dritte Hypothese wurde bereits Ende des 19. Jahrhunderts von Steven Paget aufgestellt. Seine "Seed and Soil"-Hypothese besagt, dass sich die Organspezifität aus der Abhängigkeit der metastasierenden Tumorzellen (Seed) von den Bedingungen, die im Gewebe des Sekundärorgans (Soil) herrschen, ergibt (Paget, 1989; Fidler, 2001). Bei einer erfolgreichen Entwicklung von Metastasen sind die Tumorzellen auf Faktoren der Mikroumgebung angewiesen, die die Beweglichkeit, Adhäsion ans Endothel und an die EZM, Proliferation der metastasierenden Zellen und somit das gesamte Tumorwachstum fördern. Hierzu zählen eine Reihe von Wachstumsfaktoren, eine spezielle Zusammensetzung der EZM (insbesondere Fibronektin) und bestimmte Proteasen, die für den Umbau der Matrix zuständig sind (Psaila und Lyden, 2009; Chiang und Massagué, 2008). Ein Vorhandensein von bestimmten Wachstumsfaktoren ist jedoch für die metastasierenden Zellen irrelevant, wenn sie nicht über Rezeptoren für diese Faktoren verfügen und sie somit nicht binden können. Die Ausstattung der Tumorzellen muss also mit den Bedingungen der Mikroumgebung des Metastasierungsortes übereinstimmen. Dies garantiert molekulare Interaktionen zwischen Tumorzellen und den Zellen des Zielorgans (Chambers et al., 2002). Somit zeigt sich, dass die Hypothesen nicht unabhängig voneinander betrachtet werden können, sondern nur eine Kombination als mögliche Erklärung für eine organspezifische Metastasierung in Frage kommt.

1.2.3.2 Hintergründe einer Knochen-spezifischen Metastasierung

Wie bereits in Abschnitt 1.1.4 erwähnt, sind Knochen ein bevorzugter Ort für NZK-Metastasen. Etwa 30% der NZK-Patienten entwickeln während des Krankheitsverlaufs Knochenmetastasen (Woodward et al., 2011).

Diese hohe Frequenz kann zunächst mit der starken Fenestrierung der Kapillaren des Knochenmarks begründet werden. Diese spezielle hier bestehende Struktur ist besser durchlässig für Tumorzellen und erleichtert somit die Infiltration. Dagegen sind zum Beispiel die Kapillarwände der Lungen lückenlos mit Endothelzellen ausgekleidet, was ein Durchdringen der Tumorzellen erschwert (Nguyen et al., 2009). Der Verlauf der Blutzirkulation durch den Körper spricht wiederum für eine gehäuft auftretende Verbreitung der Tumorzellen in die Lungen. Tumorzellen, die sich zum Beispiel aus einem Mammakarzinom oder NZK lösen, gelangen mit dem Blutfluss zunächst ins Herz und unmittelbar darauf in die Kapillaren der Lungen, in denen viele Zellen auf Grund des geringen Kapillarlumens "stecken" bleiben (Chambers et al., 2002).

Eine bevorzugte Metastasierung in Knochen kann auch damit erklärt werden, dass die im Knochengewebe vorherrschenden Bedingungen essentielle zelluläre Prozesse wie Motilität, Adhäsion und Proliferation von metastasierenden Tumorzellen begünstigen. Auf Grund der Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten befinden sich Knochen im permanenten Aufund Abbau. Hierbei kommt es zur Freisetzung verschiedener Faktoren, die in der Knochenmatrix ständig zur Verfügung stehen: die Wachstumsfaktoren TGFβ (*Transforming growth factor beta*), IGF I und II (*Insulin-like growth factor*), FGF (*Fibroblast growth factor*), PDGF (*Platelet-derived growth factor*) und Faktoren, die die Adhäsion der Tumorzellen in dieser Region erleichtern (EZM-Komponenten: Fibronektin und Kollagen) (Roodman, 2004; Mundy, 1997, Kominsky et al., 2007). Da es sich bei Knochen um den primären Calciumspeicher des Körpers handelt, sind Calcium-Ionen, die beim Knochenumbau freigesetzt werden und in erhöhter Konzentration vorliegen weitere wichtige Faktoren (Saidak et al., 2009a).

Bei der Untersuchung von NZK-Knochenmetastasen konnte bereits gezeigt werden, dass die dem EGF- und dem TGFβ-Rezeptor nachgeschalteten Signalwege eine wichtige Rolle bei der Bildung von Knochenmetastasen spielen (Weber, 2007). Eine bedeutende Komponente dieser Signaltransduktionswege ist der Tumorsuppressor PTEN. Diesem Protein kommt eine entscheidende Rolle bei der Bildung von Knochenmetastasen zu. Wu et al. konnten zeigen, dass PTEN die Zellmigration von Prostatakarzinomzellen hemmt, wenn diese mit von Osteoblasten konditioniertem Medium angelockt wurden. Ein Verlust der PTEN-Funktion hob diesen Effekt auf und vereinfachte die Bildung von Knochenmetastasen (Wu et al., 2007).

Die hier genannten bisher identifizierten molekularen Zusammenhänge der organspezifischen Metastasierung in Knochen sind noch nicht vollständig verstanden. Zudem könnte vielen weiteren Molekülen dieser und anderer Signalwege eine entscheidende Bedeutung zukommen. In der vorliegenden Arbeit war es von besonderem Interesse die organspezifische Knochenmetastasierung unter dem Aspekt des Calcium-angereicherten Knochenmilieus aufzuklären. Aus diesem Grund soll im nächsten Abschnitt vertieft auf Calcium und seinen zellulären Rezeptor, den Calcium-sensitiven Rezeptor (CaSR), eingegangen werden, und die bisher bekannte Rolle bei der Bildung von Knochenmetastasen anderer Tumorentitäten beschrieben werden.

1.3 Die Rolle des Calcium-sensitiven Rezeptors (CaSR) und Calciums bei der Knochen spezifischen Metastasierung

1.3.1 Calcium und CaSR

Calcium erfüllt wesentliche Aufgaben im Körper: Es ist Bestandteil von Knochen, als intrazellulärer Transmitter aktiv (z.B. in Nerven- und Muskelzellen) und erforderlich für die Blutgerinnung. Extrazellulär beeinflusst es die Durchlässigkeit von Epithelien und Endothelien. Für die Regulierung des Calcium-Haushalts sind hauptsächlich die Nieren und die Nebenschilddrüsen zuständig. Hierbei kommt dem Calcium-sensitiven Rezeptor eine Schlüsselrolle zu, da die Wirkung von extrazellulärem Calcium auf die Zelle hauptsächlich über ihn bedingt wird.

Der CaSR wurde erstmals 1993 von Brown et al. beschrieben (Brown et al., 1993). Er gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Hu und Spiegel, 2007). Zur Bewältigung der Regulation der Calcium-Homöostase wird der CaSR in der gesunden Niere exprimiert und ist entlang des gesamten Nephrons lokalisiert (Riccardi et al., 1998). Hier kann er Veränderungen sowohl im Urin als auch in Interstitialflüssigkeit detektieren. Neben der Regulation der Calcium-Homöostase ist der CaSR in der Niere für die Phosphat-Homöostase, den Kationentransport und die damit verbundene Konzentrierung des Urins zuständig. Hinzu kommen Aufgaben bezüglich der Ansäuerung des Urins und die Renin-Sekretion (Riccardi und Brown, 2010). Die Konzentrierung des Urins wird einerseits durch Blockierung der renalen Wirkung des Parathormons bewirkt, was in einer verstärkten Phosphatausscheidung resultiert (Ba et al., 2003). Andererseits reduziert der CaSR den parazellulären Calcium- und Magnesium-Transport und die hormonstimulierte Natriumchlorid-Ausscheidung über Reduktion von cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) und Aktivierung der Proteinkinase C (Herbert et al., 1997). Durch Stimulation der Protonenausscheidung durch ATP-Synthasen reguliert der CaSR die Ansäuerung des Urins (Renkema et al., 2009). Durch die Reduktion der Bildung von cAMP wird zudem die Sekretion des Enzyms Renin gefördert. Dies führt zur gesteigerten Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, das zur Blutdrucksteigerung dient und ebenfalls zur Regulation den Wasser- und Ionenhaushalt beiträgt (Beierwaltes, 2010).

In der Nebenschilddrüse reguliert der CaSR die Parathormon (PTH)-Sekretion. Fällt die vom CaSR wahrgenommene Calcium-Konzentration unter den Sollwert, kommt es zur Ausschüttung von Parathormon aus den Nebenschilddrüsen. PTH sorgt für eine verstärkte Mobilisierung von Calcium aus dem primären Calciumspeicher, den Knochen, und für eine Resorption im distalen Tubulus der Niere. Ist der Sollwert wieder erreicht, wird über den CaSR die PTH-Sekretion gestoppt (Schmidt et al., 2005). Die normale Calcium-Konzentration steigt vom Plasma bis ins Innere der Knochen extrem an (Abbildung 1.7) (Peacock, 1980).

der

Abbildung 1.7: Unterschiedliche Calcium-Konzentrationen in den einzelnen Kompartimenten des Knochenmilieus (Peacock, 1980). Die Calcium-Konzentration steigt deutlich in Richtung Knochenmatrix an. Im Plasma beträgt sie 10 mM, extrazellulär 20 mM, intrazellulär 200 mM, im Knochen erreicht sie ihr Maximum von 40 M. Im Extrazellularraum und im Plasma befinden sich jedoch nur 50% in der ionisierten Form, der Rest liegt in Komplexen vor.

Nach Aktivierung durch extrazelluläres Calcium reguliert der CaSR über verschiedene intrazelluläre Signalwege eine Vielzahl von zellulären Prozessen, wie Zellproliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose (Brown und McLeod, 2001; Brennan und Connigrave, 2009). Die genauen Mechanismen dieser Signalweiterleitung werden in Abschnitt 1.3.3 beschrieben.

Neben dem CaSR besteht für Calcium die Möglichkeit über alternative Rezeptoren auf die Zelle einzuwirken. Zwei weitere Calcium-sensitive G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind die metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR) und die y-Aminobuttersäure (GABA)-Rezeptoren. Ihre physiologische Relevanz in Bezug auf die Calcium-Signalweiterleitung ist jedoch noch unklar und scheint wesentlich unbedeutender als die des CaSR zu sein (Brown und McLeod, 2001; Kubo et al., 1998; Wise et al., 1999). Des Weiteren kann eine Reihe von Ionenkanälen der TRP (transient receptor potential channels)-Familie den Calcium-Einstrom in die Zelle modulieren (Hsu et al., 2007; Prevarskaya et al., 2007). Kommt es zur Sekretion von S100-Proteinen, können auch diese extrazelluläres Calcium binden und durch Interaktionen mit transmembranen Proteinen zelluläre Funktionen regulieren, die an der Metastasierung beteiligt sind (Helfman et al., 2005).

In aktuellen Studien wird diskutiert, ob die erhöhte Calcium-Konzentration im Knochenmilieu zur organspezifischen Bildung von Knochenmetastasen beitragen könnte und welche Rolle hierbei dem CaSR zukommt.



1.3.2 Calcium und CaSR bei der Knochenmetastasierung anderer Tumorentitäten

Knochen lassen sich vor allem durch ihre hohe Konzentration an Calcium charakterisieren. In keinem anderen Organ des Körpers kommt es zu einer so starken Calcium-Anreicherung (Peacock, 1980). Da sich Knochen in diesem Aspekt von anderen Organen unterscheiden, könnte genau das dafür ausschlaggebend sein, dass Tumorzellen bevorzugt in dieses Milieu migrieren, hier gute Wachstumsbedingungen finden und schließlich eine organspezifische Metastase bilden. Diese Überlegungen können jedoch nur dann zutreffen, wenn die Tumorzellen fähig sind, Calcium wahrzunehmen. Sie müssten also im Besitz des CaSR sein.

1.3.2.1 Calcium und CaSR als Induktoren der Knochenmetastasierung im Mamma- und Prostatakarzinom

Die Forschungsarbeiten anderer Arbeitsgruppen geben Hinweise darauf, dass Calcium und der CaSR bei der Knochenmetastasierung des Mamma- und Prostatakarzinoms eine bedeutende Rolle zukommt. Die Arbeitsgruppe um Saidak et al. konnte zeigen, dass Calcium einen fördernden Effekt auf die chemotaktische Migration von Mammakarzinomzellen hat. Dieser Effekt zeigte sich besonders stark in den Zelllinien, die aus Patienten mit Knochenmetastasen stammten und somit ein erhöhtes Potenzial zur Bildung dieser hatten. Die Wirkung von Calcium auf die Tumorzellen kam über den CaSR zustande (Saidak et al., 2009b). Die Arbeitsgruppe Liao et al. führte Untersuchungen an Prostatakarzinomzellen durch. Sie konnte zeigen, dass eine erhöhte Calcium-Konzentration die Zellproliferation und Adhäsion von Tumorzellen stimuliert, die aus Patienten mit Knochenmetastasen kultiviert wurden. In diesen Zellen konnte zudem eine Überexpression des CaSR detektiert werden. Stammten die untersuchten Tumorzellen aus Patienten, bei denen es nicht zur Ausbildung von Metastasen kam, löste Calcium keine Stimulation der Proliferation aus. Liao et al. untersuchten in ihrer Arbeit auch die beteiligten Signalwege. Als entscheidend stellten sich hierbei der Akt- und der Erk-Signalweg heraus, da sie durch Calcium in den Tumorzellen aktiviert wurden (Liao et al., 2006). Weitere Effekte von Calcium zeigten sich bezüglich des programmierten Zelltods. Calcium wirkt über den CaSR inhibierend auf die Apoptose von Prostatakarzinomzellen die sich durch ein erhöhtes Potenzial zur Metastasierung in Knochen ausweisen. Hieran sind ebenfalls der Akt-Signalweg und die p38 MAPK beteiligt, jedoch nicht Erk (Tfelt-Hansen et al., 2004). Eine detaillierte, zusammenfassende Beschreibung der für die Metastasierung wichtigen Signalwege, die dem CaSR nachgeschaltet sind, erfolgt in Abschnitt 1.3.3.

Diese Entdeckungen sprechen stark dafür, dass der erhöhten extrazellulären Calcium-Konzentration in Knochen und dem CaSR eine bedeutende Rolle bei der Knochenmetastasierung zukommt. Ob Calcium ein entscheidender Faktor bei der Bildung von NZK-Knochenmetastasen ist, muss noch geklärt werden. Die Expression des CaSR im NZK wurde ebenfalls noch nicht untersucht. Bezüglich dieser Aspekte sind noch keine Forschungsergebnisse publiziert.

1.3.2.2 Interaktionen zwischen Tumorzellen und Osteoklasten in der Knochenmatrix via Calcium und CaSR zur Anpassung des Metastasierungsortes

Wie bereits in Abschnitt 1.2.3.2 erwähnt, gibt es in der Knochenmatrix über Calcium hinaus weitere Faktoren, die eine Bildung von Metastasen begünstigen. Alle diese Faktoren werden verstärkt freigesetzt, wenn Tumorzellen nach Eintritt in die Knochenmatrix mit Osteoklasten interagieren und somit die Osteolyse vorantreiben (Abbildung 1.8). Hierdurch können die metastasierenden Tumorzellen durch ihre eigene Aktivität die Knochenmatrix noch besser an ihre Bedürfnisse anpassen (Keller et al., 2001; Yin et al., 2005).



Abbildung 1.8:

Schematische Darstellung der bidirektionalen Interaktionen von metastasierenden Mammakarzinomzellen und Osteoklasten, modifiziert nach Saidak et al., 2009. Der Hintergrund dieser Interaktionen liegt in der verstärkten Sekretion von PTHrP durch Mammakarzinomzellen. Dies initiiert den Knochenabbau und die Freisetzung von Faktoren, die das Wachstum der Tumorzellen fördern. Ein sogenannter Teufelskreis entsteht. Im Gegensatz zu malignen Zellen führt die Aktivierung des CaSR in gesunden Zellen zu einer Reduktion der PTHrP-Sekretion und nicht zu einer Förderung des Knochenabbaus.

Durch Analysen an metastasierenden Mammakarzinomzellen konnte ein mögliches Modell für den Ablauf der bidirektionalen Interaktionen zwischen Tumorzellen und Osteoklasten skizziert werden. Im Gegensatz zu gesunden Zellen schütten Mammakarzinomzellen vermehrt PTHrP (*Parathormon related protein*) aus. PTHrP wirkt in ähnlicher Weise auf den Knochen wie PTH, das für die Regulation der Calcium-Homöostase zuständig ist: Es stimuliert die Bildung von Osteoklasten (Burtis et al., 1987; McCauley und Martin, 2012). Eine größere Anzahl von Osteoklasten sorgt für einen intensiveren Abbau der Knochensubstanz. Dadurch wird die Freisetzung verschiedener Faktoren verstärkt, die das Wachstum der Tumorzellen in den Knochen begünstigen. Zu diesen Faktoren zählen Calcium, die EZM-Komponenten Fibronektin (FN) und Kollagen (KN) und die Wachstumsfaktoren IGF, TGF, PDGF und FGF. Da die PTHrP-Sekretion der Tumorzellen durch Calcium verstärkt wird, führt die zelluläre Interaktion zu einem sogenannten Teufelskreis. In gesunden Zellen führt die Aktivierung des CaSR zu einer Reduktion der PTHrP-Sekretion. Der verstärkte Knochenabbau bleibt somit aus (Mihai et al., 2006; Mundy, 1997; Saidak et al., 2009a).

1.3.3 Calcium-Signalweiterleitung via CaSR

Der CaSR koordiniert die zelluläre Antwort auf eine veränderte extrazelluläre Calcium-Konzentration über verschiedene Signaltransduktionswege. Über die Regulation von Migration, Proliferation und Apoptose ist er maßgeblich an den Prozessen der Metastasierung beteiligt (Brennan und Conigrave, 2009; Manning et al., 2006). In Abschnitt 1.3.2.1 wurden bereits einige Signalmediatoren angesprochen, die durch den CaSR aktiviert werden. Es gibt eine Vielzahl weiterer Moleküle, die in direkten Zusammenhang mit der Calcium-Signalweiterleitung gebracht werden (Abbildung 1.9).

Eine Aktivierung des CaSR führt zu einer Konformationsänderung des heterotrimeren G-Proteins durch Austausch von GDP (Guanosindiphosphat) gegen GTP (Guanosintriphosphat). Das G-Protein dissoziiert in eine α - und eine $\beta\gamma$ -Untereinheit. Die aktivierte α -Untereinheit überträgt das Signal des CaSR auf unterschiedliche intrazelluläre Moleküle (Krauss, 2003). Über die MAPK-Signalkaskaden (Erk, p38 α und JNK) und der ihr nachgeschalteten Kinasen und Transkriptionsfaktoren reguliert der CaSR Zellproliferation und Apoptose (Tfelt-Hansen et al., 2003; Ogata et al., 2006). Der CaSR ist desweiteren über eine Aktivierung der PI3-Kinase in die Regulation des Akt-Signalwegs involviert (Li et al., 2012). Proliferation und Apoptose werden über mTOR und verschiedene Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Die Migration wird durch Umstrukturierung des Zytoskeletts mittels Rho-GTPasen gefördert (Abschnitt 1.2.2 und Abbildung 1.6). Außerdem findet sich eine Verbindung zwischen dem CaSR und dem Phospholipid C (PLC) (Huang und Miller, 2007). Über Veränderung der Aktivität dieses Signalmoleküls greift der CaSR ebenfalls in die Regulation der Proliferation ein. PLC spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in die beiden *second messengers* Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). Dies führt zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und zur Freisetzung intrazellulärer Calciumionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum (Krauss, 2003). Eine Fehlregulation dieser essentiellen zellulären Funktionen kann zur Förderung der Metastasenbildung und des Tumorwachstums führen.



Abbildung 1.9:

Schematische Darstellung der Wirkung von Calcium via CaSR auf verschiedene intrazelluläre Signalwege. Die vom CaSR beeinflussten Signalwege münden in der Regulation von zellulären Prozessen wie Migration, Apoptose und Proliferation. Eine Fehlregulation kann eine erfolgreiche Metastasierung begünstigen.

Schließlich kommt es auch zur Inhibition der Adenylatzyklase und somit zur Reduktion von cAMP (Saidak et al., 2009a). Durch ein Absinken der intrazellulären cAMP-Konzentration wird dessen Hauptziel, die Proteinkinase A (PKA), weniger stark aktiviert. Die Proteinkinase

A ist in die Aktivierung des Energiestoffwechsels involviert und sorgt für die Phosphorylierung von Ionenkanälen und Transkriptionsfaktoren (Krauss, 2003).

1.3.4 Regulation der Expression des CaSR

In der Literatur werden verschiedene Mechanismen diskutiert, die zu einer Regulation der CaSR-Expression führen können. Calcitriol kommt als positiver Regulator des CaSR in Frage. Calcitriol ist die biologisch aktive Form des Prohormons Vitamin D₃ und wird in der Niere und der Leber produziert. Die Produktion wird durch Parathormon stimuliert. Durch eine verstärkte Freisetzung von Calcium aus den Knochen hält das Parathormon die extrazelluläre Calcium-Konzentration aufrecht. Calcitriol kommt die Aufgabe zu diesen Knochenabbau wieder auszugleichen. In der Niere und im Darm fördert es die Calcium- und Phosphat-Resorption, was die Mineralisierung der Knochen unterstützt. Ein Zusammenspiel von Parathormon und Calcitriol reguliert somit die Calcium-Homöostase (Dusso et al., 2005; Schmidt et al., 2005). Die Wirkung von Calcitriol kommt über Genregulation zustande. Nach Bindung an den Vitamin-D-Rezeptor gelangt es in den Zellkern und reguliert die Transkription verschiedener Gene. Hierzu zählt unter anderem der CaSR (Abukawa et al., 2001; Dusso et al., 2005). Canaff und Hendy gelang es sogar zwei VDREs (Vitamin D Response Elements) in der Promotorregion des CaSR-Gens zu identifizieren (Canaff und Hendy, 2002). Die Wirkung von Calcitriol auf den CaSR im NZK ist jedoch umstritten. Calcitriol liegt in vielen verschiedenen Tumoren, so auch im NZK, reduziert vor und könnte somit seine regulatorische Wirkung auf den CaSR eventuell nicht ausüben (Ikuyama et al., 2002; Blomberg et al., 2010).

Bei zwei weiteren beschriebenen Regulatoren der CaSR-Expression handelt es sich um Phosphat und oxidiertes LDL (*Low Density Lipoprotein*). Bei Erkrankung an sekundärem Hyperparathyreoidismus kommt Phosphat eine hemmende Wirkung auf den CaSR zu (Drücke, 2004). Oxidiertes LDL erhöht dagegen die Expression des Rezeptors (Guo et al., 2010). Eine Beeinflussung durch extrazelluläres Calcium selbst konnte durch Arbeiten von zwei unterschiedlichen Arbeitsgruppen an Rattennieren ausgeschlossen werden (Rogers et al., 1995; Brown et al., 1996).

1.3.5 Allosterische Modulation des CaSR

Es wurden bereits einige synthetische allosterische CaSR-Modulatoren entwickelt, die Potenzial haben, als Therapeutika bei einer Dysfunktion der Regulation der CalciumHomöostase zum Einsatz zu kommen. Hierbei gibt es zwei Arten von Modulatoren: *Calcilytics* und *Calcimimetics*. *Calcimimetics* erhöhen die CaSR-Aktivität, *Calcilytics* hemmen den CaSR. Alle Derivate gehören zur Gruppe der Phenylalkylamine (Saidak et al., 2009c). Der einzige in der Klinik zugelassene CaSR-Modulator ist Cinacalcet. Er kommt zum Einsatz bei Patienten mit Hyperparathyreoidismus und sorgt durch CaSR-Aktivierung für eine verminderte Ausschüttung des Parathormons (Jensen und Bräuner-Osborne, 2007). Ein inhibierender CaSR-Modulator ist unter der Bezeichnung NPS 2143 bekannt (Nemeth, 2002). Eine Behandlung mit NPS 2143 reduziert die Sensitivität des CaSR gegenüber Calcium und die intrazelluläre Signalweiterleitung. Aus diesem Grund wird derzeit diskutiert, ob *Calcilytics* als mögliche Therapeutika zur Prävention und Behandlung bei Knochenmetastasen in Frage kommen (Saidak et al., 2009c).

1.4 Zielsetzung

Bei etwa 30% aller NZK-Patienten kommt es zur Ausbildung von Knochenmetastasen. Diese hohe Frequenz deutet darauf hin, dass NZK-Zellen bevorzugt in dieses Organ metastasieren, da die Knochenmatrix ein günstiges Milieu für das Wachstum von NZK-Zellen bietet. Zwar ist schon viel über die allgemeinen Mechanismen der Metastasierung bekannt, die Hintergründe für die spezifische Metastasierung in dieses Organ sind jedoch noch relativ unklar. Aus diesem Grund bestanden die Ziele der vorliegenden Arbeit in der Aufklärung der Prozesse der organspezifischen NZK-Metastasierung in Knochen und der daran beteiligten Faktoren und intrazellulären Mechanismen.

Da sich Knochen als das Organ mit der höchsten Calcium-Konzentration auszeichnen, könnte Calcium entscheidend auf die Bildung von Knochenmetastasen einwirken. In anderen Tumorentitäten wurden bereits Zusammenhänge zwischen den Effekten von Calcium auf Tumorzellen, der Expression des CaSR und einer bevorzugten Metastasierung in Knochen hergestellt. Für das NZK sind solche Hinweise noch nicht bekannt.

Die Tatsache, dass der CaSR in der Niere exprimiert wird, bietet die Grundlage dafür, dass Nierenkarzinomzellen sensitiv für Calcium sind. Dies setzt voraus, dass es auf Grund der malignen Transformation nicht zur vollständigen Reduktion der CaSR-Expression kommt. Um dies zu klären, sollte in der vorliegenden Arbeit zunächst die CaSR-Expression in gesundem und malignem Nierengewebe und primären Tumorzellen von NZK-Patienten untersucht und mit dem Metastasierungsstatus korreliert werden. Zudem sollte geklärt werden, ob Calcium an der Regulation der CaSR-Expression beteiligt ist. Anhand der NZK-Tumorzellen sollte daraufhin dargestellt werden, ob Calcium zelluläre Prozesse wie Migration, Adhäsion und Proliferation beeinflusst und somit potenziell Metastasierung fördern könnte. Des Weiteren bestand ein Ziel dieser Arbeit in der Aufklärung der hieran beteiligten molekularen Mechanismen. In anderen Tumorentitäten konnten zwar schon einige involvierte CaSR-Signalwege aufgedeckt werden, es ist jedoch fraglich, ob diese auch für die Knochenmetastasierung des NZK verantwortlich sind. Die Rolle des CaSR bei der durch Calcium begünstigten Knochenmetastasierung sollte durch gezielte Hemmung verifiziert werden. Schließlich sollte in dieser Arbeit auch die Target-Therapie einbezogen werden, da sie derzeit die Therapieoption mit der höchsten Ansprechrate darstellt. Ziel war es zu klären, ob die Behandlungserfolge einer TKI-Behandlung mit dem Metastasierungspotenzial des Tumors und der Lokalisation der Metastase zusammenhängen.

Die Aufklärung der Rolle von Calcium und seinem Rezeptor für die NZK-Knochenmetastasierung könnte erheblich dazu beitragen weitere prognostische Marker aufzudecken und neue Ansätze für Therapieoptionen zu finden bzw. die bestehenden Therapiemöglichkeiten zu optimieren. Ein fundiertes Wissen über die molekularen Veränderungen, die bei NZK-Patienten zur Knochenmetastasierung führen, würde die Forschung dem Ziel einer individualisierten Therapie einen Schritt näher bringen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

2-Methylbutan (Roth, Karlsruhe), Aceton (AppliChem, Darmstadt), Agarose (Amersham, Biosciences, Freiburg), Alamarblaulösung AlamarBlue Alkopharm (Invitrogen), (Brüggemann), Ammonium-Persulfat (APS) (Roth, Karlsruhe). Amniomax C100 Basalmedium (Gibco), Amniomax C100 Supplement (Gibco), Antibody Diluent (Dako, Carpinteria, USA), Aprotinin (Roche, Mannheim), Aqua ad injectabilia (Braun, Melsungen), Aqua Dest. (Braun, Melsungen), Benzamidin (Merck, Darmstadt), Bovine Serum Albumin Bromphenolblau/Xylencyanol (BSA) (Sigma), (Sigma Chemie. Deisenhofen), Calciumchlorid (Sigma, Steinheim), Cinacalcet (Selleck), Control Mouse IgG1 (Dako, Glostrup, DK), Coomassie-Färbelösung Roti-Blue (Roth, Karlsruhe), DAB (3,3'-Diaminobenzidin) (Dako, Carpinteria, USA), Deconex Laborreiniger (Borer Chemie), Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), Dithiotreithol (DTT) (Roth, Karlsruhe), dNTP Mix (Promega Corporation, Madison), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (PAA), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (Gibco), Entellan (Merck, Darmstadt), Essigsäure (Roth, Karlsruhe), Ethanol (AppliChem, Darmstadt), Ethidiumbromid 0,7 mg/ml (Eurobio, Raunheim), Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (Merck, Darmstadt), Fibronektin (Lyophilisat, steril) (Invitrogen), Formaldehyd (Sigma, St. Louis, USA), Fötales Kälberserum (FCS, frei von Doxycyclin) (PAA), Hemacolor-Lösungen 2 und 3 (Merck, Darmstadt), HEPES 1M (Gibco); Immersionsöl (Merck, Darmstadt), Iscove Basal Medium (Biochrom AG, Berlin), Isopropanol (AppliChem, Darmstadt), Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt), Kollagen Typ I lyophilisiert (IBFB, Leipzig), Kollagen Typ IV lyophilisiert (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), Kollagenase II (Invitrogen, Darmstadt), Kristallviolett (Sigma), Light Cycler 480 SYBR Green I Master (Roche, Mannheim), LSAB+ System-HRP (Dako, Carpinteria, USA), Magermilchpulver (AppliChem, Darmstadt), Magnesiumchlorid (Sigma Chemie, Deisenhofen), Mayers Hämalaun (Merck, Darmstadt), McCoy's 5A Medium (Gibco, Life Technologies), Methanol reinst (Merck, Darmstadt), Mercaptoethanol-B (Sigma Chemie, Deisenhofen), MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazoliumbromid) (Sigma), Nagellack Express Nailcare (Maybelline Jade, New York), Natronlauge (AppliChem, Darmstadt), Natriumdodecylsulfat (SDS) (Biorad, Richmond, USA); Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe), NPS 2143 hydrochloride (Tocris Bioscience), Orange Dye (Sigma), Pazopanib (LC Laboratories), PCR-Puffer 10x (Perkin Elmer, Norwalk), Penicillin/Streptomycin 100x (Anti-Anti) (Gibco, Life Technologies), Peroxidase Blocking Solution (Dako, Carpinteria, USA), Phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF) (Sigma), Phosphatase-Inhibitor (Sigma, Steinheim), Protease-Inhibitor Cocktail (Sigma), Puffertabletten nach Weise (Merck, Darmstadt), Roti-Block (Roth, Karlsruhe), Roti-Blot Anodenpuffer (Roth, Karlsruhe), Roti-Blot Kathodenpuffer (Roth, Karlsruhe), Roti-Blue (Roth, Karlsruhe), Rotiphorese 10x SDS-PAGE-Laufpuffer (Roth, Karlsruhe), Rotiphorese-Gel 30 (30% Acrylamid-Stammlösung) (Roth, Karlsruhe), RPMI + Glutamin (Rosewell Park Memorial Institute) 1680-Medium (Gibco), Salzsäure (Merck, Darmstadt), Schwefelsäure (Merck, Darmstadt), Sorafenib (LC Laboratories), Sunitinib (LC Laboratories), GoTaq-Polymerase (Promega), Terg-a-zyme (Enzymreiniger) (Sigma), Terralin Protect (Schülke), Tetramethylethylendiamin (TEMED) (Roth, Karlsruhe), Tris (hydroxyl-methyl-aminomethan) (Roth GmbH, Karlsruhe), Tris-(hydroxyl-methyl-amino-methan)HCl (Merck, Darmstadt), Tris-HCl Buffer 0,5 M pH 6,8 (Biorad), Tris-HCl Buffer 1,5 M pH 8,8 (Biorad), Triton X-100 (Boehringer, Mannheim), Trypsin-EDTA 0,25% (Sigma), Tween 20 (AppliChem), Vitronektin from human plasma (Lyophilisat, steril) (Sigma, St. Louis), Wash Buffer 10x für Immunzytochemie (Dako, Carpinteria, USA), Western Lightning ECL plus (Perkin Elmer Life Sciences, Waltham, USA), Xylol (Merck, Darmstadt)

2.1.2 Puffer und Lösungen

Zum Ansetzen der Puffer und Lösungen wurde destilliertes Wasser verwendet.

Agarosegel (1%)	1 g Agarose 100 ml 1x TAE
Anodenpuffer	16 ml Roti Blot A 32 ml Ethanol abs. 84 ml H ₂ O
Blocking-Puffer	5% Milchpulver 1x TBS / 0,1%Tween 20
Calciumchloridlösung 1 M	1,47 g CaCl ₂ 10 ml H ₂ O
Coomassie-Färbelösung	60 ml H ₂ O 20 ml Methanol 20 ml Roti-Blue 5x
Entfärbelösung	7,5% Essigsäure 25% Ethanol ad Aqua dest.
-----------------------------	--
Ethidiumbromid-Färbelösung	5 μg EtBr/ml H ₂ O
Paraformaldehyd-Lösung 4%	4 g Paraformaldehyd 100 ml PBS erhitzen mit 2 N NaOH lösen und abkühlen mit 6 N HCl auf pH 7,2
Kathodenpuffer	16 ml Roti Blot K 32 ml Ethanol abs 84 ml H ₂ O
Kollagenaselösung 1mg/ml	1 mg Kollagenase II 1 ml PBS
Kristallviolett-Lösung 0,5%	0,25 g Kristallviolett 50 ml Ethanol 2%
Lysepuffer	 10% 1x Puffer C 1% DTT 0,5 mM 1% Phosphatase-Inhibitor 1% Protease-Inhibitor 2% PMSF 2 mM ad Aqua dest.

10 mg NPS 2143 2,25 ml DMSO

350 mM TrisHCl, pH 6,8
34,3% Glycerol
10% SDS
0,93 g DTT
10% β-Mercaptoethanol
0,06% Bromphenolblau

20 mM Hepes 0,2 M NaCl, 1,5 mM MgCl₂ 0,4 mM EDTA 1% Triton X-100

Puffer C 10x

NPS-Lösung 10 mM

Proteinprobenpuffer 6x

Puffer nach Weise	1 Puffertablette nach Weise ad 1 1 H ₂ O, pH 6,8
Sammelgel 4% (Ansatz für 2 Gele)	3,4 ml H ₂ O 630 μl Tris-HCl Buffer 0,5M pH 6,8 830 μl Acrylamid 50 μl SDS 10% 50 μl APS 10% 5 μl TEMED
Sammelgel 4% (Ansatz für 2 Gele, große Kammer)	7,2 ml H ₂ O 9,8 ml Tris-HCl Buffer 0,5M pH 6,8 2,7 ml Acrylamid 200 μl SDS 10% 100 μl APS 10% 20 μl TEMED
TAE 10x	400 mM Tris 1 mM EDTA, pH 8
TBS (Tris Buffered Saline) pH 7,5 10x	4,24 g Tris 292,7 g NaCl 26 g TrisHCl ad 1 1 H ₂ O
Trenngel 10% (Ansatz für 2 Gele)	3,8 ml H ₂ O 2,6 ml Tris-HCl Buffer 1,5M pH 8,8 3,4 ml Acrylamid 100 μl SDS 10% 100 μl APS 10% 4 μl TEMED
Trenngel 7,5% (Ansatz für 2 Gele, große Kammer)	19,4 ml H ₂ O 10 ml Tris-HCl Buffer 1,5M pH 8,8 10 ml Acrylamid 400 µl SDS 200 µl APS 20 µl TEMED
Waschpuffer	0,05% Tween 20 1x PBS

2.1.3 Kits

BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific Pierce, Rockford, USA) cDNA-Synthese Kit SuperScript II (Invitrogen, Karlsruhe) Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric) (Roche, Mannheim) Human Phospho-Kinase Array Kit (R&D Systems, Abingdon, UK) RNA Isolation Kit (RNeasy Kit, Quiagen, Hilden)

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Primärantikörper

Akt Antibody, polyclonal, rabbit (Cell Signaling, Danvers, USA), β-Actin Antibody, monoclonal, mouse, Clone AC-74 (Sigma, Steinheim), Calcium Sensing Receptor Antibody, monoclonal, mouse (Sigma, Steinheim), Calcium Sensing Receptor (6D4) Antibody, mouse, monoclonal (Santa Cruz, Santa Cruz, USA), Cytokeratin pan, mouse monoclonal (Abcam, Cambridge, UK), Erk1/2 Antibody, polyclonal, rabbit (R&D Systems, Abingdon, UK), FAK Antibody, polyclonal, rabbit (Millipore, Temecula, USA), Integrin a5 Antibody, polyclonal, rabbit (Cell Signaling, Danvers, USA), Nedd4.1 (H-135) Antibody, polyclonal, rabbit (Santa Cruz, Santa Cruz, USA), Phospho-Akt (Ser473) Antibody, monoclonal, rabbit (Cell Signaling, Danvers, USA), Phospho-Akt (Thr308) Antibody, monoclonal, rabbit (Cell Signaling, Danvers, USA), Phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204, Tyr185/Tyr187) Antibody, monoclonal, rabbit (R&D Systems, Abingdon, UK), Phospho-FAK (Tyr397) Antibody, polyclonal, rabbit (Cell Signaling, Danvers, USA), Phospho-FAK (Tyr397) Antibody, monoclonal, mouse (Upstate, Lake Placid, USA), Phospho-Shc (Tyr239/240) Antibody, polyclonal, rabbit (Cell Signaling, Danvers, USA), PTEN (138G6) Antibody, monoclonal, rabbit (Cell Signaling, Danvers, USA), Shc Antibody, polyclonal, rabbit (Cell Signaling, Danvers, USA)

2.1.4.2 Sekundärantikörper

Donkey anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz, Santa Cruz, USA) Goat Anti-Rabbit IgG/HRP (Dako, Glostrup, DK) Rabbit anti-Mouse IgG/HRP (Dako, Glostrup, DK) Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (Invitrogen, Eugene, USA)

2.1.5 Oligonukleotide

Calcium-sensitiver Rezeptor (CaSR)-Primer Forward: 5'-AAG AAA GTT GAG GCG TGG CAG-3' Reverse: 5'-GAG GTC CCA GTT GAT GAT GGA-3' TATA-Box Bindungsprotein (TBP)-Primer Forward: 5'-GGA TAA GAG AGC CAC GAA CCA C-3' Reverse: 5'-GGC CTT CCT GAA CAC CTT AG-3'

Pyruvat-Dehydrogenase (PDH)-Primer Forward: 5´-GAC CAA TGG ACA TGG AAA CC-3´ Reverse: 5´-TGG CAA CCG TAA CAG ACA AA-3´

2.1.6 Größen- und Molekulargewichtsstandards

BenchMark Prestained Protein Ladder (Invitrogen, Karlsruhe), Magic Mark XP (Invitrogen, Karlsruhe), 2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 kb) (NEB, Frankfurt), Lambda DNA/HindIII Marker (Thermo Fisher Scientific Fermentas, St. Leon-Rot), 100bp DNA Ladder (Invitrogen, Karlsruhe)

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

96 Well Cell Culture Plate (Greiner BioOne, Frickenhausen), Deckgläser Marienfeld 24x50mm (Marienfeld), Handschuhe (Maimed); Küvetten (Brand), Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden), Light Cycler 480 Multiwell Plate 96 mit Versiegelungsfolie (Roche, Mannheim), Objektträger mit Mattrand 76x26mm (Diagonal), Parafilm M (Laboratory Film, Chicago); Pasteur-Pipetten 150mm und 230mm (VWR), PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml) (PEQlab, Erlangen), Zellkulturschale steril 94x16mm, 145x20mm (Greiner BioOne, Frickenhausen), Pipetten (serologisch) 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml (Greiner BioOne, Frickenhausen), Pipettenspitzen mit/ohne Filter 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Starlab), Polycarbonat-Membran 25 x 80 mm, Porengröße 8 µm (Neuro Probe), Poly Screen PVDF Transfer Membrane (Perkin Elmer), PP (Polypropylen)-Röhrchen (15 ml und 50 ml) (Greiner Bio One, Frickenhausen), Reacti-Bind Amine-Binding Maleic Anhydride 96-Well Plate (Thermo Fisher Scientific Pierce, Rockford, USA), Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf, Hamburg), Skalpelle, einmal, steril (Braun), Spitzbodenröhrchen (15 ml und 50 ml) (Greiner One, Bio Frickenhausen), Universal-Alufolie, Filterpapier (Biorad, München), Zellkulturflasche 25 cm², 75 cm², 150 cm² (Greiner BioOne, Frickenhausen), Zellsieb 70 µm (BD, New Jersey, USA)

2.1.8 Gebrauchsmaterialien

Boyden-Kammer (48-Well-Mikro-Chemotaxis-Kammer) (Costar, Bodenheim), Cell Lifter (Costar, Cambridge), Cell Scraper (Nunc, Roskilde), Filterklemmen (klein und groß) (Costar, Bodenheim), Filterwischer (Costar, Bodenheim), Glasküvetten (Glaswerk Weinheim), Halterung für Objektträger (Diapath, München), Laborwecker (VWR), Nalgene Cryo Freezing container (Nalgene Nunc International, Roskilde, DK), Neubauer-Kammer (Merck, Darmstadt), Pinzetten (flache, glatte Spitze) (Labotec, Wiesbaden), Pipetten research Eppendorf (0,5-10 µl, 1-100 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl) (Eppendorf, Hamburg), Pipettierhilfe Accu-jet pro (Brand, Wertheim), Quarzküvetten, Schichtdicke 10 mm (Hellma, Mühlheim)

2.1.9 Geräte

Absaughilfe Vacuboy (IBS Integra Biosciences, Fernwald), Blotting-Apparatur Trans Blot Turbo (BioRad, USA), CO₂-Inkubator Hera Cell 240 (Heraeus, Hanau), Zytospin-Zentrifuge 1200 (Hettich Universal), Dampfsterilisator Varioklav (H+P Labortechnik), Detektionssystem Dokumentationssystem E.A.S.Y.-Videosystem (Herolab, Wiesloch), Eppendorf-Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg), Fluorchem E (Biozym), Eismaschine (Ziegra), ELISA Reader Anthos 2010 (Anthos, Krefeld); Durchflusszytometer FACSCalibur (BD Biosciences, New Jersey, USA), Gefrierschrank -20°C (Bosch, Gerlingen), Gefrierschrank -80°C (Nalgen Nunc Int, Penfield, USA), Gelelektrophoresekammer Mini Protean Tetra System (BioRad, USA), Gelelektrophoresekammer hergestellt in der Werkstatt der Universitätsmedizin Mainz, Heißluftsterilisator Heraeus Oven (Thermo Fisher Scientific), Heiz-/Magnetrührer (IKA Labortechnik, Stauffen), Heizblock Dri-Block-3 (Techne, Stone, UK). Heizblock Eppendorf Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg), Inkubationsschüttler VSR 23 (Grant Boekel, Cambridge, England), Kryo-Stickstofftank Locator 6 Plus (Thermo Fisher Scientific Thermoline, Langenselbold), Kühlschrank 4°C Cooler (Bosch, Gerlingen), Labor-Feinwaage (Sartorius, Göttingen), Laborschüttler IKA (Labotec, Wiesbaden), Laborwaage (Sartorius, Göttingen), Light Cycler 480 Real-Time PCR System (Roche, Mannheim), Mikro-Kühlzentrifuge 202 MK (Sigma, Osterode), Mikroskop Axioskop 40 (Zeiss, Oberkochen), Mikroskop Axiovert 40CFL (Zeiss, Oberkochen), Mikroskopkamera AxioCam MRc5 (Zeiss, Oberkochen), Mini-Gelkammer mit Gelträger und Gelkämmen (PEQlab, Erlangen), pH-Meter 211 (Hanna Instruments), Photometer Genesys 6 (Thermo Spectronic), Power Supply PP2000 (Biometra, Göttingen), Sicherheitswerkbank Steri Flow (Heraeus, Hanau), Stabilisierende Gleichstromquelle (PEQlab, Erlangen), Thermocycler Touchdown Hybaid (Hybaid, Heidelberg), Tischzentrifuge 3722L (Thermo Fisher Scientific), Ultraschallbad Sonorex Super RK510 (Bandelin), Ultraschallgerät Sonoplus (Bandelin Electronic, Berlin), Ultraschallstab (Bandelin Electronic, Berlin), Ultra-Turrax (IKA Labortechnik, Stauffen), Vakuumpumpe MiniVac Power (PeqLab), Vakuum-Zentrifuge Hetovac (Nunc, Wiesbaden), Vortex VF2 (IKA, Staufen), Wasserbad Aqualine AL18 (Lauda, Lauda-Königshofen), Zentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg), Zentrifuge MegaFuge 1.0R (Heraeus, Hanau)

2.1.10 Verwendete Proben

2.1.10.1 Gewebeproben

Alle verwendeten Gewebeproben stammten von NZK-Patienten, die in der Urologischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz oder Jena nephrektomiert wurden. Vor Entnahme der Gewebeproben wurde das Einverständnis der Patienten eingeholt. Die Diagnose NZK wurde mit Hilfe einer Hämatoxylin- und Eosin-Färbung gestellt. Die Patienten wurden so ausgewählt, dass gleiche Anteile von Patienten vorhanden waren, die innerhalb von 5 Jahren nach Nephrektomie keine Metastasen, Lungen- oder Knochenmetastasen ausgebildet hatten (jeweils 10 Patienten). Außer den Lungen- bzw. Knochenmetastasen kam es bei einem Teil der Patienten zusätzlich zur Ausbildung von Metastasen in den Lymphknoten, im zentralen Nervensystem, in der Leber oder zur Ausbildung eines Lokalrezidivs. Bei den ausgewählten Patienten mit Lungenmetastasen kam es jedoch nie zur Ausbildung von Knochenmetastasen, was eine exakte Unterscheidung dieser beiden Patientengruppen in der Auswertung gewährleistete. Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit beschränkt sich die Bezeichnung der Patientengruppen auf die Ausbildung von Knochen- bzw. Lungenmetastasen. Die zusätzlichen Metastasierungsorte werden nicht mehr erwähnt. Die Gewebeproben wurden nicht nur bezüglich der Metastasierungsorte in Gruppen unterteilt, sie wurden ebenfalls hinsichtlich Histologie, Grading, Staging, Geschlecht und Tumorgröße aufeinander abgestimmt.

2.1.10.2 Primäre Zellen

Alle verwendeten primären Zellen stammten aus Gewebeproben von NZK-Patienten, die in der Urologischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz nephrektomiert wurden. Beim Primärtumor handelte es sich in allen Fällen um ein klarzelliges Nierenkarzinom. Vor Entnahme der Gewebeproben wurde das Einverständnis der Patienten eingeholt. Die Diagnose NZK wurde mit Hilfe einer Hämatoxylin- und Eosin-Färbung gestellt. Die Patienten wurden so ausgewählt, dass gleiche Anteile von Patienten vorhanden waren, die innerhalb von 5 Jahren nach Nephrektomie keine, Lungen- oder Knochenmetastasen ausgebildet hatten (jeweils 3 Patienten).

2.1.10.3 Kontinuierliche Zelllinien

A-498 (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville Maryland):

Die Zelllinie A-498 ist ebenfalls eine Tumorzelllinie mit epithelialer Morphologie. Sie entstammt aus einem papillären Nierenkarzinom einer 52jährigen weiblichen Patientin (www.ATCC.org; Giard et al., 1973). Diese Zelllinie exprimiert endogenes PTEN, ist also PTEN-positiv, jedoch kein VHL (unpublizierte Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe).

786-O (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville Maryland):

Bei der Zelllinie 786-O handelt es sich um eine Tumorzelllinie mit epithelialer Morphologie, die aus dem Primärtumor eines klarzelligen Nierenkarzinoms eines 58jährigen männlichen Patienten kultiviert wurde (www.ATCC.org). Der Patient wies multiple Lungenmetastasen auf. Knochenmetastasen konnten nicht nachgewiesen werden (Strewler et al., 1983). Diese Tumorzelllinie exprimiert kein endogenes PTEN und kein VHL (unpublizierte Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe).

Dibo (Urologische Klinik und Poliklinik, Universitätsmedizin Mainz):

Die Zelllinie Dibo wurde in der Urologischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz durch die eigene Arbeitsgruppe etabliert. Sie stammt aus einem Lokalrezidiv der Milzvene. Beim Primärtumor handelte es sich um ein klarzelliges Nierenzellkarzinom (pT 3b, G2). Der Patient war 50 Jahre alt, männlich und ist 9 Jahre nach der Operation verstorben. Der Patient entwickelte Knochenmetastasen, die jedoch nach palliativer Bestrahlung nicht mehr nachweisbar waren.

CCF-RC-1 (Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, Ohio):

Die Zelllinie RC-1 (CCF-RC-1) stammt aus dem Primärtumor einer Niere eines 67-jährigen Patienten und besitzt epitheliale Morphologie. Zum Zeitpunkt der Nephrektomie wurden beim Patienten Knochenmetastasen nachgewiesen (Hashimura et al., 1989).

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung von Proben aus NZK-Patientengewebe

Gewebeproben wurden unter sterilen Bedingungen aus der Niere nephrektomierter NZK-Patienten entnommen. Hierzu wurden mit Hilfe von Einmalskalpellen jeweils ein Gewebestück aus malignem und aus vom Tumorort entfernt liegenden gesundem Epithelgewebe des Nierencortex geschnitten. Die Gewebeproben wurden in vorgekühlten 2-Butanol eingelegt, unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80°C gelagert.

2.2.2 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der exponentiellen Vermehrung eines bestimmten DNA-Abschnitts. Der Mechanismus der PCR beruht auf einer enzymatischen Kettenreaktion. Zur Durchführung einer PCR benötigt man eine doppelsträngige DNA-Matrize und zwei spezielle synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer), die den zu amplifizierenden Abschnitt der Matrize flankieren. Als Enzym dient die hitzeresistente *Taq*-Polymerase, die aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* stammt. Des Weiteren werden Desoxynukleotide und ein PCR-Puffer benötigt, der unter anderem Mg²⁺ als Cofaktor für die *Taq*-Polymerase enthält. Jeder Zyklus der PCR besteht aus 3 Schritten, die je nach gewünschter DNA-Menge 28-35 mal wiederholt werden. Im ersten Schritt der PCR kommt es zur Denaturierung der doppelsträngigen DNA unter Hitzeeinwirkung (94°C). Der zweite Schritt dient der Anlagerung (Annealing) der Primer an die komplementäre DNA, wobei das Annealing bei 55°C am Effizientesten abläuft. Im dritten Schritt werden die beiden neuen DNA-Stränge unter Anbau der Nukleotide an die Primer mittels der *Taq*-Polymerase synthetisiert (Elongation).

2.2.2.1 PCR (Polymerase-Kettenreaktion) zum Nachweis von *CaSR* cDNA in NZK-Gewebeproben

In diesem Versuch sollte nachgewiesen werden, ob Tumor- und Normalgewebeproben von NZK-Patienten ohne bzw. mit Knochen- oder Lungenmetastasen cDNA des *CaSR* enthält. Als zu amplifizierende DNA-Matrize diente somit cDNA aus Tumor- und Normal-Nierengewebe von jeweils einem Patienten ohne Metastasen bzw. mit Knochen- oder Lungenmetastasen. Hierzu wurde zunächst die Gesamt-RNA aus Tumor- und Normalnierengewebe mit Hilfe eines Kits isoliert (RNeasy Kit, Quiagen). Die isolierte RNA

wurde mittels einer reversen Transkriptase in cDNA für PCR umgeschrieben. Hierzu wurde ein cDNA-Synthese-Kit verwendet (SuperScript II, Invitrogen). Die Versuchsdurchführung zur RNA-Isolierung und cDNA-Synthese wird hier nicht weiter erläutert, da dies bereits in vorausgegangenen Dissertationen durchgeführt wurde und die cDNA-Proben somit schon zur Verfügung standen (Plattfaut, 2011; Frees, 2008).

Die für die PCR verwendeten Primer waren der h-*CaSR*-Forward und der h-*CaSR*-Reverse Primer. Sie wurden in einer Konzentration von 20 pmol eingesetzt. In einem zusätzlichen PCR-Ansatz wurden Pyruvat-Dehydrogenase (PDH)-Primer eingesetzt. Da die PDH ein Haushaltsgen ist, konnte anhand der Amplifikation dieses Gens die Qualität der verwendeten cDNA überprüft werden.

Für die Durchführung der PCR wurde je Probe ein 50 µl-Ansatz in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß angesetzt:

5 μl 10x PCR-Puffer
1 μl dNTPs
0,25 μl Go*Taq*- Polymerase
1 μl cDNA
1 μl Primer Forward
1 μl Primer Reverse
ad 50 μl H₂O dest.

Für die Negativkontrolle wurde die cDNA durch 1 µl destilliertes Wasser ersetzt. Die PCR wurde mit Hilfe eines im Thermocycler *Touchdown Hybaid* eingespeicherten Programms durchgeführt. Das Programm durchlief dabei folgende Schritte, wobei die Schritte 2-4 34mal wiederholt wurden:

1. Initiale Denaturierung	1 Minuten, 93°C
2. Denaturierung	1 Minute, 93°C
3. Annealing	1 Minute, 60°C
4. Elongation	1 Minute, 72°C
5. Finale Elongation	7 Minuten, 72°C
6. Abkühlung	∞, auf 4°C

Zur Überprüfung, ob die PCR erfolgreich war, wurde im Anschluss an die PCR die amplifizierte cDNA auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert.

2.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung der PCR-Produkte

Um zu ermitteln ob die durch die Primer vorgegebenen cDNA-Abschnitte mittels PCR erfolgreich amplifiziert wurden, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese wurde durchgeführt. Während einer Agarose-Gelelektrophorese werden die negativ geladenen Nukleinsäure-Fragmente in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt. Je kleiner die Fragmente sind, desto weiter wandern sie durch die Poren des Gels. Hierbei ist es möglich Fragmentgrößen von 75 bp bis 15 kbp aufzutrennen, je nach Agarosekonzentration. Die Banden können durch anschließendes Färben mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht werden, da dieses in die DNA interkaliert.

Zur Herstellung eines 2% igen Agarosegels wurden 2 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen wurde das noch flüssige Gel in eine Gelkammer aus Plexiglas gegossen, in die vorher ein Gelkamm eingesetzt wurde. In etwa 15-20 Minuten erfolgte die Polymerisation des Gels. Nach Überschichtung mit 1x TAE-Puffer wurde der Kamm entfernt. Nun konnten die 20 µl-Probenansätze aufgetragen werden, mussten aber vorher mit 3 µl Ladepuffer versetzt werden, welcher die Proben erschwert und anfärbt. Um die Bandengrößen ablesen zu können, wurden etwa 8 µl eines 100 bp und des Lambda HindIII-Größenstandards aufgetragen. Je nach Gelgröße wurde eine Spannung von 70-150 Volt angelegt und die Proben innerhalb von 1-2 Stunden aufgetrennt. Zur Einfärbung der Banden wurde das Gel für etwa 15 Minuten in eine Ethidiumbromid-Färbelösung (5 µg/ml) gelegt und daraufhin für weitere 15 Minuten in destilliertem Wasser entfärbt. Die Banden konnten schließlich mit UV-Licht bei λ =320 nm visualisiert werden. Mittels des *Herolab E.A.S.Y.*-Videosystems wurde eine Aufnahme des Gels gemacht.

2.2.3 Quantitative Real-Time PCR zum Nachweis von CaSR cDNA in NZK-Gewebeproben

Die quantitative Real-Time PCR dient nicht nur der Vervielfältigung eines bestimmten Nukleinsäureabschnitts nach dem Schema einer PCR, sie bietet zusätzlich die Möglichkeit dessen Quantifizierung durch DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe. Je mehr Fluoreszenzsignale in der exponentiellen Phase der PCR messbar sind, desto häufiger ist der DNA-Matrizenstrang in der Probe enthalten. Somit lassen sich Unterschiede bezüglich der Genexpression in verschiedenen Proben feststellen. Um die amplifizierten DNA-Fragmente von ebenfalls entstehenden, kürzeren Primer-Dimeren zu unterscheiden, wird im Anschluss der PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierbei wird durch langsame Erhöhung der Temperatur eine Denaturierung der Doppelstränge durchgeführt. Dies führt zur Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs, dessen Fluoreszenz schließlich abnimmt. Da Primer-Dimere einen wesentlich geringeren Schmelzpunkt haben, als die spezifisch amplifizierten DNA-Produkte, ist ihre Fluoreszenz bei steigender Temperatur früher zu messen. Somit lassen sich Primer-Dimere von dem eigentlichen DNA-Produkt unterscheiden und beeinflussen nicht die Auswertung der einzelnen Proben. Um einen Referenzwert für die eingesetzte Menge an Nukleinsäure zu erhalten, wird eine zusätzliche quantitative Real-Time PCR für ein konstitutiv exprimiertes Haushaltsgen durchgeführt.

Die in dieser Arbeit durchgeführte quantitative Real-Time PCR diente der Messung der Menge an vorhandener *CaSR* mRNA in malignen und gesunden Nierengewebeproben von NZK-Patienten, die sich bezüglich der Ausbildung von Metastasen (keine, Lungen- oder Knochenmetastasen) unterschieden. Zur Quantifizierung der *CaSR* mRNA und der mRNA für das als Referenzgen dienende TATA-Box Bindungsprotein (TBP) in NZK-Gewebeproben, wurde zunächst die Gesamt-RNA mit Hilfe eines Kits isoliert (RNeasy Kit). Die isolierte RNA wurde mittels einer reversen Transkriptase in cDNA für Real-Time PCR umgeschrieben. Hierzu wurde ein cDNA-Synthese-Kit verwendet (SuperScript II). Die Versuchsdurchführung zur RNA-Isolierung und cDNA-Synthese wird hier nicht weiter erläutert, da dies bereits in vorausgegangenen Dissertationen durchgeführt wurde und die cDNA-Proben somit schon zur Verfügung standen (Plattfaut, 2011; Frees, 2008).

Für die Durchführung der quantitativen Real-Time PCR wurde je Probe ein 10 µl-Ansatz in eine 96-Wellplatte pipettiert. Als Primer dienten ein CaSR-spezifischer Forward und Reverse Primer.

- $3 \ \mu l \quad H_2 O$
- 0,5 µl Primer Forward (10 pmol)
- 0,5 µl Primer Reverse (10 pmol)
- 5 µl Light Cycler 480 SYBR Green I Master
- 1 µl cDNA bzw. H₂O als Negativkontrolle

Die PCR wurde mit Hilfe eines *Light Cycler 480 Real-Time PCR Systems* durchgeführt. Das Programm durchlief folgende Schritte, wobei die Amplifikation in 50 Zyklen vollzogen wurde:

1. Denaturierung	10 Minuten, 95°C
2. Amplifikation	5 Sekunden, 95°C
	5 Sekunden, 61°C
	10 Sekunden, 72°C
5. Schmelzkurve	4,4°C/Sekunde bis 95°C
6. Abkühlung	∞, auf 4°C

Für jede der untersuchten Proben wurde ein Doppelansatz gemessen. Im ersten Durchlauf musste zunächst eine Konzentrations-Standardreihe mit einer beliebigen Probe (Normalgewebe aus der Niere) etabliert werden. Die hierbei entstandene Standardkurve konnte in den folgenden Untersuchungen als Referenz zur Quantifizierung der *CaSR* mRNA herangezogen werden, da bei allen weiteren Messungen eine festgelegte Probe der Standardreihe mitgemessen wurde. Die Erstellung von Boxplots aus den gemessenen Werten erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS. Die Signifikanz wurde durch den Mann-Whitney-U-Test ermittelt.

2.2.4 Arbeiten mit Zellen

Das Arbeiten mit Zellen wurde in der Regel unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Da es sich um humane Zelllinien handelte, wurden die Zellen bei 37°C in einem CO₂-Inkubator mit 5% CO₂-Gehalt und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle verwendeten Materialien und Lösungen wurden entweder steril geliefert oder autoklaviert bzw. steril filtriert. Alle Lösungen wurden vor deren Verwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

2.2.4.1 Anlegen einer Primärzellkultur aus NZK-Patientengewebe

Um primäre Zellen aus NZK-Patientengewebe zu kultivieren, wurde zunächst ein Stück aus malignem Nierengewebe entnommen. Dies geschah unter sterilen Bedingungen mit einem Einmalskalpell unmittelbar nach der Nephrektomie. Zum Desinfizieren und Reinigen wurde das entnommene Tumorgewebe unter einer sterilen Werkbank für 1-2 Sekunden zuerst in 70% Ethanol und dann zweimal in PBS eingetaucht. Das Gewebestück wurde auf eine Petrischale gelegt und auf dieser mit einem Einmalskalpell in kleine Stücke zerschnitten. Zum

weiteren enzymatischen Zersetzen wurden die Gewebestücke 30-45 Minuten in 10 ml Kollagenase-Lösung (1 mg/ml) bei 37°C inkubiert. Um die Dissoziation der Zellen zu vervollständigen, wurden die Gewebestücke durch ein Zellsieb (70 µm) gepresst und in einem 50 ml-Röhrchen aufgefangen. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 1000 rpm wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 5 ml AmnioMAX-Vollmedium aufgenommen und in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.2.4.2 Kultivieren und Passagieren von Zellen

Zur Versorgung der primären Zellen wurde ausschließlich AmnioMax C100 Basalmedium verwendet. Diesem Medium wurde das dazugehörige AmnioMax C100 Supplement zugesetzt, welches u.a. fötales Kälberserum (FCS) und Antibiotika enthält. Die etablierten Zelllinien wurden mit unterschiedlichen, an ihre Bedürfnisse angepassten Vollmedien versorgt:

786-O	DMEM, Zusätze: 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin
A-498	RPMI 1640, Zusätze: 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 2,5% HEPES
RC-1	RPMI 1640, Zusätze: 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 2,5% HEPES
Dibo	RPMI 1640, Zusätze: 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 2,5% HEPES

Für einen Wechsel des Mediums, wurde das verbrauchte Vollmedium von den Zellen abgesaugt und neues Medium dazugegeben. In regelmäßigen Abständen musste auch ein Passagieren der Zellen durchgeführt werden. Dies war nötig, wenn der Boden der Zellkulturflasche fast konfluent mit Zellen bewachsen war. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen 3mal mit PBS gewaschen und das PBS nach jedem Waschschritt ebenfalls abgesaugt. Zum Lösen der Zellen vom Untergrund der Zellkulturflasche wurden sie mit Trypsin/EDTA für etwa 2-5 Minuten im CO₂-Inkubator inkubiert. Die Zellen wurden schließlich mit frischem Vollmedium vom Flaschenboden gespült, vereinzelt und nach benötigter Verdünnung in neue Kulturflaschen überführt und weiter kultiviert. Der nachfolgenden Tabelle 2.1 sind die eingesetzten Mengen an Medium und Trypsin je Größe der Zellkulturflasche zu entnehmen.

Größe der	Menge an	Menge an
Zellkulturflasche	Medium	Trypsin
25 cm ²	5 ml	0,5 ml
75 cm ²	15 ml	1 ml
175 cm ²	25 ml	1 ml

Tabelle 2.1: Eingesetzte Mengen an Medium und Trypsin pro Zellkulturflasche mit unterschiedlichen Bodenflächen.

2.2.4.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese zuerst wie oben beschrieben mit Trypsin vom Boden des Zellkulturgefäßes abgelöst und in neuem Vollmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in einem 15 ml-Röhrchen 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert, das Medium abgesaugt und das Zellsediment in 1-2 ml des entsprechenden Vollmediums mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert. DMSO dient hierbei zur Vermeidung der Ausbildung von zellschädigenden Wasserkristallen. Die Suspension wurde zu je 1 ml in Kryoröhrchen aliquotiert und über Nacht bei –80°C in einem mit Isopropanol gefüllten Kryocontainer langsam eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen zur dauerhaften Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte durch 5minütige Inkubation der Kryoröhrchen bei 37°C im Wasserbad. Die Zellen wurden in der 5fachen Menge des entsprechenden Vollmediums aufgenommen, durch Resuspendieren vereinzelt und in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um tote Zellen und das restliche DMSO zu entfernen.

2.2.4.4 Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer

Vor allen in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen mit Zellen, musste die Zellzahl auf eine bestimmte Menge eingestellt werden. Hierzu wurden die Zellen zunächst 3mal mit PBS gewaschen und mit Trypsin aus der Zellkulturflasche gelöst. Die Zellen wurden in Vollmedium aufgenommen und durch gründliches Resuspendieren vereinzelt. Die Anzahl, der sich in der Zellsuspension befindenden Zellen wurde mittels einer Neubauer-Kammer bestimmt. Hierzu wurden etwa 10 µl der Zellsuspension verwendet und zwischen Neubauer-Kammer und Deckgläschen pipettiert, bis die Kammer komplett mit Flüssigkeit gefüllt war. Es wurden die Zellen ausgezählt, die sich in den vier eingeschliffenen Großquadraten der

Kammer befanden. Aus den gezählten Zellen in diesen vier Großquadraten wurde ein Mittelwert gebildet und mit 10^4 multipliziert. Dieser Wert kommt zustande, da die Konzentration (c) von Zellen in einer Lösung als Gesamtzahl/Volumen definiert ist und das Volumen der Neubauer-Kammer V = 0,1 mm³ = 10^{-4} µm³ beträgt. Die vollständige Gleichung lautet: c = Gesamtzellanzahl/4 x 10^4 Zellen / ml Zellsuspension.

2.2.4.5 Behandlung der NZK-Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen

Einige der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche dienten der Analyse von Effekten unterschiedlicher Substanzen auf die NZK-Zellen. Die Zellen mussten somit im Vorfeld der Versuche für eine bestimmte Dauer mit diesen Substanzen inkubiert werden.

Die Behandlung mit Calcium erfolgte unter Verwendung einer Calciumchlorid-Lösung in den folgenden Konzentrationen: 2,5 mM, 5 mM und 10 mM. Die Zellen wurden für eine Dauer von 30 Minuten mit Calcium inkubiert. Die Behandlung mit dem CaSR-Inhibitor NPS 2143 erfolgte in Konzentrationen von 0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M und 100 μ M für eine Stunde. Die Tyrosinkinase-Inhibitoren Sunitinib, Sorafenib und Pazopanib wurden in den folgenden Konzentrationen zu den Zellen gegeben: 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M und 50 μ M. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den Tyrosinkinase-Inhibitoren inkubiert.

2.2.5 Immunzytochemische Färbung

Eine immunzytochemische Färbung dient dem Nachweis eines bestimmten Proteins in Zellen mittels Antikörperfärbung. Der primäre Antikörper detektiert hierbei sein spezifisches Antigen auf dem Präparat. Dieser wird durch einen biotinylierten sekundären Antikörper erkannt, welcher wiederum eine Bindung mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin eingeht. Die Peroxidase oxidiert schließlich das Chromogen DAB (Diaminobenzidin) zu einem braunen Farbstoff. Um die Auswertung der Präparate zu erleichtern, wurde eine Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun durchgeführt. Durch das zusätzliche Mitführen von Negativkontrollen (Färbung ohne primären Antikörper) kann eine unspezifische Färbung ausgeschlossen werden. Somit wird die Bindung des primären Antikörpers an das nachzuweisende Protein mit Hilfe einer indirekten Färbemethode visualisiert und kann durch Betrachtung unter einem Mikroskop ausgewertet werden.

2.2.5.1 Zytospin für immunzytochemische Färbung

Um eine immunzytochemische Färbung durchzuführen, mussten die zu untersuchenden NZK-Zellen mit Hilfe einer *Zytospin*-Zentrifuge auf Objektträger gebracht werden. Hierzu wurden die NZK-Zellen zunächst aus der Kulturflasche gelöst, in Suspension gebracht und 5 Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert. Der Medium-Überstand wurde verworfen und das Zellpellet 2mal mit PBS gewaschen. Hierauf folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Die Anzahl der in Suspension befindlichen Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf 5x 10³ Zellen / ml PBS eingestellt. Pro Zelllinie wurden in 3 Reservoirs des Aufsatzes für die *Zytospin*-Zentrifuge je 1 ml der Zellsuspension überführt. Die Zellen wurden innerhalb von 10 Minuten bei 60% Drehleistung (entsprechen 3600 rpm) auf die Objektträger aufzentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig verworfen und die Objektträger vollständig getrocknet.

2.2.5.2 Immunzytochemische Färbung zum Nachweis des epithelialen Ursprungs der primären NZK-Zellen

Nach erfolgreicher Kultivierung primärer Zellen aus dem Nierenepithel, mussten diese Zellen auf ihren epithelialen Ursprung hin überprüft werden, um auszuschließen, dass es sich nicht um nicht-epitheliale Zellen wie z.B. Fibroblasten handelt. Für die immunzytochemische Färbung wurde ein Zytokeratin pan Antikörper verwendet, der unter anderem gegen Zytokeratin 8 und 18 bindet. Diese beiden Zytokeratine werden spezifisch von Epithelzellen aus dem Nierenkarzinom exprimiert (Oosterwijk et al., 1990).

Nach dem Aufzentrifugieren der Zellen auf Objektträger und deren vollständiger Trocknung wurden diese in einen Ständer gestellt. Zur Fixierung wurde der Ständer 10 Minuten in eine mit 100% Ethanol gefüllte Glasküvette gehalten. Die Objektträger wurden 2mal kurz mit destilliertem Wasser gewaschen, bevor sie in einer feuchten Kammer 5 Minuten mit einigen Tropfen *Peroxidase Blocking Solution* inkubiert wurden. In diesem Schritt wird die endogene Peroxidase blockiert, um eine mögliche Hintergrundfärbung zu reduzieren. Die Objektträger wurden zurück in den Ständer gestellt, erneut 2mal mit destilliertem Wasser gewaschen und schließlich in 1x Waschpuffer überführt. Für die folgenden Färbeschritte wurden die Objektträger auf spezielle Aufsätze (*Coverplates*) gelegt, die ein Lumen über dem Präparat erzeugen. In diesem Lumen erfolgt die Inkubation mit den Antikörpern. Die Aufsätze mit den Objektträgern wurden in ein Färbegestell mit Abtropfkammer eingesetzt. Nun folgte eine einstündige Inkubation mit dem primären Antikörper gegen Zytokeratin pan. Dieser wurde

1:200 mit *Antibody-Diluent* verdünnt und auf die Objektträger pipettiert (100 µl pro Präparat). Nach 3maligem Waschen mit 1x Waschpuffer wurden die Präparate 30 Minuten mit je 100 µl sekundärem, biotinylierten Antikörper inkubiert. Die Objektträger wurden erneut 3mal mit Waschpuffer gewaschen und 30 Minuten mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin inkubiert. Nach weiterem 3maligen Waschen wurde schließlich für 10 Minuten mit 100 µl DAB gefärbt (1 ml DAB *Substrate Buffer* + 1 Tropfen DAB). Die Objektträger wurden aus der Halterung genommen, in den Ständer gestellt und 2mal mit destilliertem Wasser gewaschen. Zur Gegenfärbung wurden die Präparate eine Minute mit Mayer`s Hämalaun inkubiert und anschließend 10 Minuten mit Leitungswasser gespült. Darauf folgten zwei Waschschritte mit destilliertem Wasser. Die Objektträger durchliefen schließlich Inkubationen in einer aufsteigenden alkoholischen Reihe und Xylol, die sich aus folgenden Komponenten zusammensetzte:

70% Ethanol	2 Minuten
96% Ethanol	2 Minuten
100% Isopropanol	2x 2 Minuten
Xylol	3x 5 Minuten

Abschließend wurden die Präparate mit Entellan eingedeckt und trocknen gelassen. Die Objektträger konnten bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Die Auswertung der Färbung erfolgte an einem Mikroskop. Zusätzlich wurden mit einer Mikroskop-Kamera Aufnahmen gemacht.

2.2.6 Durchflusszytometrische Analyse des CaSR in primären NZK-Zellen

Die Durchflusszytometrie dient der Detektion und Quantifizierung von Zelloberflächenmolekülen. Um die Zellen detektierbar zu machen, werden sie mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern behandelt. Die Zellen werden einzeln durch eine Kapillare in das FACS-Gerät gesaugt. Hier passieren sie nacheinander die Messzelle, in welcher der an den Antikörper gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff durch einen Laserstrahl zum Fluoreszieren angeregt wird. Die Menge der von den Zellen abgegebenen Fluoreszenz ist ausschlaggebend für ein positives Signal und dementsprechend für das Vorhandensein des nachzuweisenden Oberflächenmoleküls. In der vorliegenden Arbeit diente die FACS-Analyse zum Nachweis der Expression des CaSR auf primären NZK-Zellen.

Zur Durchführung einer FACS-Analyse wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, mit Trypsin vom Boden der Kulturflasche abgelöst und mit Vollmedium in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Nach einer 5minütigen Zentrifugation bei 1200 rpm wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet gründlich in PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurden nochmals 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und anschließend mit 1 ml Paraformaldehyd (4%) 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 Minuten, 1200 rpm) wurden die Zellen 3mal mit PBS gewaschen und die Zellzahl in einer Neubauer-Kammer bestimmt. Die Zellzahl wurde mit der entsprechenden Menge an 1% BSA in PBS auf 2x 10⁶ Zellen / ml eingestellt. Pro Messansatz wurden 2x 200 µl benötigt. Zu 100 µl Zellsuspension wurde die gleiche Menge des primären Antikörpers gegen den CaSR (0,2 µg/µl in 1% BSA/PBS) bzw. eine isotypische IgG (Immunglobulin)-Kontrolle (15 µg/µl in 1% BSA/PBS) gegeben. Nach gründlichem Mischen durch Vortexen erfolgte eine 20minütige Inkubation bei 4°C. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und abzentrifugiert (5 Minuten, 1200 rpm). Der sekundäre Alex Fluor 488-gekoppelte Antikörper wurde 1:1000 in 1% BSA/PBS verdünnt und für 20 Minuten auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 4°C im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, abzentrifugiert (5 Minuten, 1200 rpm) und in 300 µl PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in FACS-Röhrchen überführt, bis zur Messung im Dunkeln aufbewahrt und unmittelbar davor durch kurzes Vortexen erneut gemischt. Die FACS-Messung wurde mit Hilfe des Durchflusszytometers FACSCalibur der Firma BD durchgeführt.

2.2.7 Chemotaxis-Versuch in der Boyden Kammer

Chemotaktische Versuche ermöglichen es, die Migrationsfähigkeit von Zellen zu überprüfen. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Versuche mit Hilfe einer 48-Well Boyden-Kammer durchgeführt. Die Zellen wurden durch ein Chemotaxin, welches sich in der Grundplatte der Kammer befindet, dazu angeregt aus der Oberplatte der Kammer durch eine poröse Polycarbonat-Membran zu wandern und sich an deren Unterseite anzuheften. Die Poren der Membran haben einem Durchmesser von 8 µm. Sie sind also wesentlich kleiner als die Zellen, was ein aktives und gerichtetes migrieren der Zellen garantiert und ein "durchrutschen" durch die Poren verhindert. Die migrierten Zellen wurden durch Anfärben sichtbar gemacht und konnten schließlich mit Hilfe eines Mikroskops ausgezählt werden.

2.2.7.1 Herstellung der Zellsuspension

Die Zellen wurden in einer Konzentration von 1x 10⁶ Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale ausplattiert. Am Vortag des Versuches wurde das Vollmedium der Zellen gegen Serum-freies Medium ausgetauscht. Ein Kultivieren ohne Serum sollte sicher stellen, dass die Zellen durch das Chemotaxin zum Migrieren angeregt werden sich aktiv durch die Membranporen zu nicht auf Grund ihres für Tumorzellen spezifischen bewegen und erhöhten Migrationspotentials. Zudem können im Serum enthaltende Stoffe die chemotaktischen Eigenschaften des Chemotaxins überdecken, was dazu führen würde, dass die Zellen nicht angelockt werden könnten. Am nächsten Tag wurde die Zellsuspension unbehandelter Zellen in der benötigten Zellkonzentration direkt hergestellt oder die Zellen zunächst mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert und anschließend die benötigte Zellzahl der Suspension eingestellt. Hierzu wurden die Zellen mittels Trypsin-Behandlung vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, in Vollmedium aufgenommen und in 15 ml Röhrchen überführt. Durch Resuspendieren wurden die Zellen vereinzelt und schließlich 5 Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde 2mal mit PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Nach Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Kammer wurde diese mit der entsprechenden Menge an Serum-freiem Medium auf $3x10^5$ Zellen / ml eingestellt. Ein abschließendes Resuspendieren musste besonders gründlich durchgeführt werden, um jegliches Verklumpen der Zellen zu vermeiden, da nur Einzelzellen durch die Poren der Membran migrieren können.

2.2.7.2 Ansetzen der Chemotaxine

Als Chemotaxine wurden Calcium und die Extrazellularmatrix-Komponente Fibronektin eingesetzt. Fibronektin lag als Lyophilisat vor und musste vor Verwendung in 1 ml destilliertem Wasser gelöst werden. Zum vollständigen Lösen musste es einige Stunden unter Schwenken inkubiert werden. Die Konzentration von Fibronektin betrug daraufhin 1 mg/ml. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20° C eingefroren. Zur Verwendung für den Chemotaxis-Versuch wurde Fibronektin mit Serum-freiem Medium auf 10 µg/ml verdünnt werden. Calcium wurde durch Verdünnung mit Serum-freiem Medium auf eine Konzentration von 10 mM gebracht.

2.2.7.3 Durchführung des Chemotaxis-Versuchs

Der Aufbau der Boyden-Kammer ist in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt. Zunächst wurden die Wells der Grundplatte der Boyden-Kammer mit den Chemotaxinen Fibronektin

und Calcium beladen. Als Negativkontrolle diente Serum-freies Medium, welches als Referenz für jede Probe ebenfalls in die Wells pipettiert wurde. Pro Well wurden 29 μ l verwendet und blasenfrei eingefüllt. Nun wurde die glänzende Unterseite der Polycarbonat-Membran auf die Grundplatte aufgelegt, welche zuvor kurz in 1x PBS eingelegt wurde. Die Membran sollte blasen- und faltenfrei aufgelegt werden, damit das Migrationsverhalten der Zellen nicht negativ beeinträchtigt wird. Auf die Membran wurde eine Dichtung gelegt, welche ein Auslaufen der Zellsuspension verhindert. Zum Schluss konnte die Oberplatte aufgelegt und mit Schrauben an der Unterplatte befestigt werden. In die Wells der Oberplatte wurden jeweils 50 μ l Zellsuspension pipettiert, wobei auch hier darauf geachtet werden musste, dass dies blasenfrei geschah. Pro Probe wurden 4 Wells in einer Reihe befüllt. Die Kammer wurde schließlich im CO₂-Inkubator bei 37°C für 16 Stunden inkubiert.



Abbildung 2.1:

Schematische Darstellung der Boyden-Kammer.

Auf der linken Seite ist die Boyden-Kammer mit Grundplatte, Membran und Oberplatte im Querschnitt dargestellt. Die rechte Seite zeigt ein vergrößertes Well und die aktive Migration der Zellen durch die 8µm-Poren der Membran.

Am nächsten Tag wurde der Versuch fortgeführt, indem die migrierten Zellen fixiert, gefärbt und ausgezählt wurden. Hierzu musste zuerst die Kammer auseinandergebaut werden. Die restliche Zellsuspension in der Oberplatte wurde durch vorsichtiges ausschwenken entfernt, die Oberplatte zusammen mit Dichtung und Membran abgenommen und umgestülpt. Die migrierten Zellen auf der ursprünglichen Unterseite der Membran befanden sich nun oben. Die Membran wurde an beiden Seiten in eine Filterklemme eingespannt. Zum Entfernen der nicht migrierten Zellen auf der ursprünglichen Oberseite der Membran wurde diese 2 mal kurz mit Puffer von Weise befeuchtet und an einem Filterwischer abgestreift. Danach wurde die Membran mit der Zellseite nach oben für 10 Minuten an der Luft getrocknet. Zur Fixierung der Zellen wurde die Membran umgedreht, mit der Zellseite für eine Minute auf Methanol gelegt und währenddessen mit den Klemmen festgehalten. Nachdem die Membran erneut mit der Zellseite nach oben für 10 Minuten getrocknet wurde, konnten die Zellen schließlich angefärbt werden. Die Färbung der Zellkerne wurde durch 3maliges Benetzen der Zellseite der Membran mit roter Hemacolor-Lösung 2 und 6maliges Benetzen mit blauer Hemacolor-Lösung 3 erreicht. Hierauf wurde die überschüssige Färbelösung durch 3maliges Eintauchen der Membran in jeweils frischen Puffer von Weise heruntergewaschen. Nach 10minütiger Trocknung der Membran konnte mit dem Eindecken begonnen werden.



Abbildung 2.2: Mikroskopische Aufnahme der migrierten Zellen. Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus einem Well von der Unterseite der Membran. Die migrierten Zellen sind violett angefärbt und deutlich größer als die ungefärbten Membranporen (Durchmesser von 8 μm). Die Aufnahme wurde mit einer Mikroskop-Kamera durch ein 4fach Objektiv gemacht.

Bevor die Membran auf einen Objektträger gebracht wurde, musste sie in der Mitte durchgeschnitten und somit an die Größe eines Objektträgers angepasst werden. Mit der Zellseite nach unten wurden die beiden Membranhälften auf je einen Objektträger gelegt, so dass sie wieder in ihrer ursprünglichen Lage betrachtet werden konnten. Nach dem Verteilen von Immersionsöl auf der Membran wurden die Deckgläschen möglichst luftblasenfrei aufgelegt und an den Rändern mit Nagellack befestigt und luftdicht abgedichtet. Die Auswertung des Chemotaxis-Versuchs erfolgte schließlich am Lichtmikroskop mit 400facher Vergrößerung. Zum Begrenzen des auszuzählenden Bereichs in einem Well diente ein Rasterokular (10x10 = 100 mm²), welches 10mal pro Well mäanderförmig ausgezählt wurde. Somit wurden pro Well 2,5 mm² ausgezählt. Aus allen gezählten migrierten Zellen der 4 Wells einer gleichen Probe wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung

berechnet. Zusätzlich wurden Aufnahmen der migrierten violett-gefärbten Zellen mit einer Mikroskop-Kamera gemacht. Die Bilder wurden mit einem 4fach Objektiv aufgenommen (Abbildung 2.2). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS. Die Signifikanz wurde durch den Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Unterschiede wurden ab einem p-Wert < 0,05 als statistisch signifikant angesehen.

2.2.7.4 Reinigung der Boyden-Kammer

Zur Reinigung der Boyden-Kammer wurden die Oberplatte, Grundplatte und die Dichtung zunächst gründlich mit destilliertem Wasser abgespült. Für eine vollständige Entfernung von Resten der Zellsuspension und des Chemotaxins wurden 5 g Terg-a-zyme in 500 ml destilliertem Wasser gelöst und die Kammer und Dichtung für mindestens eine Stunde bei 60°C in diese Lösung eingelegt. Vor der nächsten Benutzung der Kammer wurde durch erneutes Abspülen der Kammer mit destilliertem Wasser und mehrstündiges Trocknen sichergestellt, dass keine Lösungsreste mehr enthalten waren.

2.2.8 Adhäsionsversuch

Zur Untersuchung der Adhäsionsfähigkeit von Zellen an unterschiedliche Komponenten der extrazellulären Matrix wurde ein Adhäsionsversuch durchgeführt. Hierfür wurden spezielle 96-Well Platten (Reacti-Bind Amine-Binding, Maleic Anhydride 96-Well Plate) verwendet, die Aminogruppen-enthaltende EZM-Komponenten binden können. Da Zellkontakte zu EZM-Bestandteilen für das Überleben adhärenter Zellen unerlässlich sind, binden diese Zellen hieran. Um das Maß der Adhäsionsfähigkeit verschiedener Zellen an unterschiedliche EZM-Komponenten zu visualisieren, werden die adhärenten Zellen mit Kristallviolett angefärbt. Die Menge des Farbstoffs kann schließlich photometrisch gemessen werden.

2.2.8.1 Ansetzen der Extrazellularmatrix-Komponenten

Bei den in diesem Versuch verwendeten EZM-Komponenten handelte es sich um Fibronektin, Kollagen Typ I und Kollagen Typ IV. Fibronektin lag als Lyophilisat vor, welches in 1 ml destilliertem Wasser gelöst wurde. Zum vollständigen Lösen musste es einige Stunden unter Schwenken inkubiert werden. Die Konzentration der Fibronektin-Stammlösung betrug daraufhin 1 mg/ml. Kollagen Typ I lag zu 130 mg eingefroren in einem Röhrchen vor. Zu dieser Menge wurden 32,5 ml Essigsäure (0,1 M) gegeben und mehrere Stunden unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit Natronlauge neutralisiert. Die Kollagen Typ I-Stammlösung wurde mit 1x PBS auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. Kollagen Typ IV lag ebenfalls als Lyophilisat vor. Hiervon wurden 5 mg in 10 ml Essigsäure (5 mM) über Nacht bei leichtem Schwenken gelöst. Am Folgetag wurde die Lösung mit Natronlauge und Salzsäure neutralisiert. Die Konzentration der Kollagen Typ IV-Stammlösung betrug schließlich 500 μ g/ml. Alle verwendeten Substanzen wurden in einer Konzentration von 10 μ g/ml eingesetzt. Als Kontrolle diente eine BSA-Lösung der gleichen Konzentration.

2.2.8.2 Durchführung des Adhäsionsversuchs

Zur Vorbereitung der 96-Well Platte musste diese mit den einzelnen EZM-Bestandteilen beschichtet werden. In jedes Well wurden 100 µl der Substanzen bzw. der BSA-Lösung im 4fach Ansatz gegeben. Zur Bindung der Substanzen wurde die Platte über Nacht auf dem Inkubationsschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Komponenten von der Platte gegossen und diese 2mal mit Waschpuffer gewaschen (100 µl pro Well). Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 0,5% BSA in 1x PBS blockiert. Pro Well wurden 200 µl pipettiert und die Platte eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Während dieses Inkubationsschritts mussten die zu untersuchenden Zellen auf eine bestimmte Konzentration eingestellt werden. Die verwendete Zellzahl betrug $4x \ 10^5$ Zellen / ml. Es wurden pro Well 50 µl der Zellsuspension gegeben und die Platte für eine Stunde bei 37°C im CO₂-Inkubator aufbewahrt. In einem erneuten Waschschritt wurden die nicht adhärierenden Zellen mit 100 µl Waschpuffer pro Well von der Platte gewaschen. Dieser Waschschritt wurde einmal wiederholt. Zum Fixieren der Zellen wurden diese 15 Minuten mit 100 µl pro Well 4% Paraformaldehyd inkubiert. Nach einem erneuten Waschschritt mit 1x PBS (100 µl pro Well) erfolgte die Färbung mit pro Well 50 µl 0,5% iger Kristallviolett-Lösung für 10 Minuten. Die Kristallviolett-Lösung wurde durch 3maliges Waschen mit Waschpuffer (100 µl pro Well) gründlich von der Platte gespült. Die Platte wurde schließlich auf einem Tuch vollständig trocknen gelassen. Um den Farbstoff aus den Zellen zu lösen, wurden diese 30 Minuten mit 2% SDS inkubiert (100 µl pro Well). Die Überstände wurden schließlich in eine neue 96-Well Zellkulturplatte überführt und deren Absorption bei einer Wellenlänge von 550nm (Referenzwellenlänge 650nm) im ELISA-Reader gemessen.

2.2.9 Analyse der Zellproliferation mittels BrdU (Bromdesoxyuridin)-Inkorporation

Die Untersuchung der Zellproliferation mit Hilfe des *Cell Proliferation ELISA BrdU*-Kits beruht auf dem Prinzip der BrdU-Inkorporation während der DNA-Synthese proliferiender Zellen. Während der DNA-Replikation kommt es zum Einbau des Pyrimidin-Analogons BrdU anstelle von Thymidin in die neu synthetisierte DNA. Das inkorporierte BrdU wird durch einen spezifischen Peroxidase-gekoppelten Antikörper detektiert. Die Peroxidase setzt sein Substrat schließlich in einen messbaren Farbstoff um. Die Menge dieses Farbstoffes ist dementsprechend ein Maß für den Einbau von BrdU in die replizierte DNA und für die Proliferationsrate der Zellen.

Vor der Durchführung des Versuchs mussten die Zellen in einer bestimmten Konzentration in 96-Well Zellkulturplatten ausgesät und für insgesamt 48 Stunden bei 37°C im CO₂-Inkubator kultiviert werden. Die Konzentration der Zellen wurde auf 5x 10³ Zellen / 200 μ l für ein Well eingestellt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit den Substanzen behandelt, deren Effekte auf die Proliferation untersucht werden sollten. Da sich die Vorbehandlungsdauer der unterschiedlichen Substanzen unterscheidet, wurde der Proliferationsversuch noch am gleichen Tag oder erst am Folgetag durchgeführt. Jeder zu untersuchende Ansatz wurde 4fach bestimmt.

Um die BrdU-Arbeitslösung herzustellen, musste die BrdU-*Labeling Solution* zunächst 1:100 mit PBS verdünnt werden. Von dieser Lösung wurden nun 20 μ l in jedes Well gegeben und die 96-Wellplatte 2 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. In dieser Zeit wurde das BrdU in die DNA der proliferierenden Zellen eingebaut. Die BrdU-Arbeitslösung wurde von den Zellen abgegossen und durch 200 μ l pro Well FixDenat ersetzt. In dem nun folgenden 30minütigen Inkubationsschritt bei Raumtemperatur wurden die Zellen fixiert und die DNA denaturiert. Nach Abgießen der Fixierungslösung wurde pro Well 100 μ l BrdU-Antikörper (*anti-BrdU-POD Working Solution* 1:100 verdünnt in *Dilution Solution*) auf die Zellen gegeben und eine Stunde inkubiert. Es folgten drei Waschschritte mit 1x Waschpuffer (200 μ l pro Well). Anschließend wurde die Substrat-Lösung (100 μ l pro Well) für 15 Minuten in die Wells gegeben. Zum Mischen der Lösungen wurde die 96-Wellplatte für ein Minute bei 300 rpm auf den Schüttler gestellt. Die Absorption des entstandenen Farbstoffs wurde schließlich bei einer Wellenlänge von 450nm (Referenzwellenlänge 690nm) in einem ELISA-Messgerät quantifiziert.

2.2.10 Arbeiten mit Proteinen

Mit Hilfe von Proteinanalysen lassen sich die molekularen Hintergründe veränderter zellulärer Funktionen dadurch aufklären, dass man veränderte Proteinexpressionen und

Aktivitätsmuster verschiedener Proteine detektieren kann. In dieser Arbeit wurde dies durch Westernblot-Analysen und mittels eines Phospho-Kinase Arrays bewerkstelligt. Vor der Durchführung dieser Proteinanalyse-Methoden müssen die Proteine zunächst aus Zellen bzw. Gewebe extrahiert und ihre Konzentration bestimmt werden.

2.2.10.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus NZK-Zellkulturen für Westernblot-Analysen

Im Vorfeld einer Gesamtproteinextraktion wurden $1x \ 10^6$ Zellen in einer Zellkulturschale (94mm) ausplattiert. Nach 48 Stunden Kultivierung bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Je nach Dauer der Inkubation mit den unterschiedlichen Substanzen wurde die Proteinextraktion am gleichen Tag oder am darauffolgenden Tag durchgeführt.

Am Tag der Extraktion wurde zuerst das Medium abgesaugt und die Zellen 3mal mit je 10 ml eiskaltem 1x PBS gewaschen. Die Schale wurde sofort auf Eis gestellt und jeweils 500 µl Lysepuffer auf den Zellen verteilt. Der Lysepuffer wurde erst unmittelbar vor Verwendung angesetzt. Mit einem mit Ethanol (70%) gereinigten Zellschaber wurden die Zellen von der Schale abgelöst und mit einer Pipette in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Proben wurden für 30 Minuten auf Eis inkubiert, mit mehrmaligem Vortexen zwischendurch. Schließlich wurden die Proteine durch eine Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C für 10 Minuten von sedimentierenden unerwünschten Zellkompartimenten getrennt. Die Proteine im Überstand wurden in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Im Anschluss konnte die Proteinkonzentration bestimmt und die gewünschte Proteinmenge durch eine Fällung mit Aceton eingestellt werden. Die Proteine wurden bei -20°C eingefroren.

2.2.10.2 Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus NZK-Gewebe für Westernblot-Analysen

Zur Extraktion von Proteinen aus NZK-Gewebe wurde ein gefrorenes Gewebestück mit einem gekühlten Skalpell auf ca. 3x 3 mm (bzw. 50 mg) zurechtgeschnitten. Dieses Gewebestück wurde direkt in 500 µl eiskalten Lysepuffer in einem vorgekühlten Röhrchen gegeben. Die Probe wurde so lange mit einem Ultraturrax zerkleinert, bis keine Stückchen mehr sichtbar waren (ca. eine Minute). Nach einer 15minütigen Inkubation auf Eis wurde die Probe für eine Minute bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Mit einem Ultraschallstab wurde die Probe weiter aufgeschlossen. Die Probe wurde hierbei auf Eis gestellt und mit 3x 10 Stößen behandelt. Das Lysat wurde für 10 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugiert und die im Überstand enthaltenen Proteine in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt (siehe Abschnitt 9.3), das Lysat zu je 50 µl aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.10.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um weitere Analysen mit Proteinextrakten durchzuführen, musste die Proteinmenge der Probe bekannt sein. Hierzu wurde eine quantitative Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des *BCA Protein Assay Reagent* Kits durchgeführt. Das Prinzip dieser Messmethode beruht auf der Reaktion von einwertigen Kupferionen mit Bicinchoninsäure (BCA) zu einem violetten, messbaren Farbkomplex. Da die Kupferionen zuerst von Proteinen reduziert werden müssen, bevor sie mit BCA einen Farbkomplex bilden können, korreliert die Menge an vorhandenen Proteinen mit der Menge des entstehenden Farbstoffs.

Zur Messung der Proteine wurden 10 µl Proteinlösung mit 40 µl destilliertem Wasser verdünnt. Hierzu wurden pro Probe 1 ml BCA-Reagenz (Reagenz A und B im Verhältnis 50:1) gegeben. Während einer 30minütigen Inkubation bei 37°C kam es zur Bildung des Farbkomplex. Die Proben wurden schließlich in Einmalküvetten überführt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 562nm im Photometer gemessen. Mittels einer zuvor angelegten BSA-Eichkurve konnte aus der Absorption die entsprechende Konzentration ermittelt werden.

2.2.10.4 Fällung von Proteinen

Um eine für Westernblot-Analysen ausreichende Proteinkonzentration zu erreichen, mussten die extrahierten Proteine mit Aceton gefällt werden. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit nur mit den Proteinen aus Zellen durchgeführt, da aus Gewebe immer Protein in ausreichender Menge extrahiert wurde. Zum Fällen wurde die gewünschte Menge an Protein in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß auf Eis überführt und mit der 9-fachen Menge an eiskaltem Aceton versetzt. Die Probe wurde über Nacht bei -20° C gefällt. Am Folgetag wurden die Proteine 10 Minuten bei 13.000 und 4°C abzentrifugiert und das Aceton verworfen. Das Proteinsediment wurde für maximal 5 Minuten in einer Vakuumzentrifuge vollständig von Aceton befreit und in der entsprechenden Menge 2x Ladepuffer gelöst (10 µl Ladepuffer pro 100 µg Protein). Die Proteinproben wurden bis zur Verwendung bei -20° C gelagert.

2.2.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblot-Analyse von Gesamtproteinextrakten aus NZK-Zellkulturen

2.2.11.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Eine SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) dient der Auftrennung von Proteinen ihrer Größe nach in einem elektrischen Feld und der nachfolgenden Analyse mittels Westernblot. Das anionische Detergenz SDS überdeckt hierbei die Eigenladung der Proteine und verleiht ihnen eine einheitliche negative Ladung. Dies stellt sicher, dass die Proteine nur entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Um die entstehenden Banden während der Westernblot-Analyse den verschiedenen Proteinen zuordnen zu können, wird ein Molekulargewichtsstandard mit auf das Gel aufgetragen. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einer diskontinuierlichen Gelelektrophorese gearbeitet, in der zwei verschiedene Gelarten verwendet werden. Im Sammelgel sammeln sich zuerst alle Proteine an einem Startpunkt auf gleicher Höhe, um dann zeitgleich ins Trenngel zu wandern, in dem es schließlich zur eigentlichen Proteinauftrennung kommt.

Zur Vorbereitung der SDS-PAGE wurden das Sammel- und das Trenngel gegossen. Zuerst wurde das 10% ige Trenngel gegossen und mit Ethanol überschichtet. Nach etwa 30-45 Minuten war es auspolymerisiert und das Sammelgel (4%) konnte darüber gegossen werden. In dieses Gel wurde ein sample-well Kamm eingesetzt, um Probentaschen zu erhalten. Nach Polymerisation des Sammelgels, wurden die Gele in die Gelelektrophoresekammer Mini Protean Tetra System gestellt und diese mit einem Liter 1x Laufpuffer gefüllt. Der Kamm wurde vorsichtig aus dem Sammelgel gezogen und die nun vorhandenen Taschen mit 1x Laufpuffer gespült. Bevor die mit Ladepuffer versetzten Proben aufgetragen wurden, mussten sie für 10 Minuten in einem Heizblock aufgekocht werden, um sie zu denaturieren. Es wurden je Probe 10 µl (10µg/µl, entsprechen 100 µg pro Probe) in die Taschen pipettiert. Des Weiteren wurden 8 µl des gefärbten BenchMark Prestained Protein Ladder und 6 µl des ungefärbten Molekulargewichtstandards Magic Mark XP aufgetragen. Das Gel wurde bei 90 Volt für ca. 30 Minuten laufen gelassen, bis die Lauffront das Trenngel durchwandert hatte. Danach wurde das Gel weitere 2-3 Stunden bei 110 Volt laufen gelassen, bis die Proben die Lauffront erreicht hatten. Anschließend wurde das Gel aus der Kammer entnommen und für eine nachfolgende Westernblot-Analyse verwendet.

2.2.11.2 Westernblot-Analyse

Eine Westernblot-Analyse dient dem Nachweis von zuvor durch eine SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen aus Proteinextrakten. Zunächst müssen die Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Transfermembran transferiert werden. Dieser Vorgang wird als "Blotten" bezeichnet und durch einen Stromfluss ermöglicht. In diesem Stromfluss, wandern die negativ geladenen Proteine aus dem Gel in Richtung Anode und binden an die PVDF-Transfermembran. In dieser Arbeit wurde das Blotten mittels Semidry-Verfahren in der Blotting-Apparatur Trans Blot Turbo durchgeführt. Schließlich konnten die zu analysierenden Proteine durch Antikörperfärbung nachgewiesen werden. Zuerst wurde mit dem Primärantikörper inkubiert, anschließend mit dem Sekundärantikörper. Auf Grund der Kopplung des Sekundärantikörpers an eine Peroxidase konnte im nächsten Schritt durch Zugabe einer Substratlösung eine Chemilumineszenzreaktion ausgelöst werden. Diese Reaktion wurde mit Hilfe des Detektionssystems Flurochem E visualisiert und aufgenommen.

Um die Proteine nach erfolgter Auftrennung durch eine SDS-PAGE auf die PVDF-Membran zu transferieren, musste diese zunächst zurechtgeschnitten und äquilibriert, also aufnahmefähig für Proteine gemacht werden. Dies geschah während einer 1minütigen Inkubation in Ethanol absolut. Anschließend wurde die Membran 2 Minuten in destilliertes Wasser und 5 Minuten in Anodenpuffer gelegt. Des Weiteren wurden 12 Filterpapiere zurechtgeschnitten und jeweils 6 Papiere in Anodenpuffer und 6 Papiere in Kathodenpuffer eingeweicht. Das SDS-Gel wurde vorsichtig von den Glasplatten genommen und das Sammelgel entfernt. Bevor die einzelnen Komponenten in die Blotting-Apparatur gelegt wurden, wurden die Anode mit Anodenpuffer und die Kathode mit Kathodenpuffer angefeuchtet.

Der Blot wurde nach folgendem Schema aufgebaut:



Das Aufeinanderlegen der einzelnen Komponenten musste sorgfältig und luftblasenfrei geschehen. Entstandene Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen wurden mit einem speziellen Blot-Roller entfernt. Bei nicht entfernten Luftblasen, kann es an diesen Stellen zu einem unvollständigen Proteintransfer kommen. Der Protein-Transfer erfolgte innerhalb von 30 Minuten bei 25 Volt.

Nachdem Auseinandernehmen der Blotting-Apparatur wurde die Membran für eine Stunde auf einem Inkubationsschüttler in etwa 20 ml Blocking-Lösung inkubiert. Dieser Schritt diente dem Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen. Nachfolgend wurde der Primärantikörper auf die Membran gegeben. Bis auf den Primärantikörper gegen β -Aktin wurden alle Primärantikörper 1:1000 mit Blocking-Lösung verdünnt. Der Antikörper gegen β -Aktin wurde 1:5000 in 1x Rotiblock verdünnt. Die Membran wurde in ein 50 ml-Röhrchen gelegt und mit etwa 5 ml Primärantikörper über Nacht bei 4°C auf dem Rollenmischer inkubiert.

Vor Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran am Folgetag 3mal 10 Minuten mit 1x TBS mit 0,1% Tween gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde 1:1000 mit Blocking-Lösung verdünnt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Die Membran wurde erneut 3mal 10 Minuten mit 1x TBS mit 0,1% Tween gewaschen. Zur Vorbereitung der Substratlösung wurden die ECL-Substanzen 1:1 verdünnt. Pro Membran wurden 3 ml ECL-Lösung benötigt, die gleichmäßig auf die Membran aufgetropft wurden. Nach einer Inkubation von einer Minute, wurde die Membran in Klarsichtfolie gelegt. Die Chemilumineszenzreaktion der an den Sekundärantikörper gekoppelten Peroxidase mit dem in der ECL-Lösung enthaltenen Luminol wurde mittels des Detektionssystems Flurochem E aufgenommen. Die Exposition variierte je nach Antikörperfärbung zwischen wenigen Sekunden und einigen Minuten. Die visualisierten Proteinbanden wurden an einem PC mit Hilfe der Software *Image J* densitometrisch ausgewertet und mit der Menge an aufgetragenem Gesamtprotein verrechnet.

Bevor eine weitere Antikörperfärbung durchgeführt werden konnte, mussten die gebundenen Antikörper durch "Strippen" der Membran entfernt werden. Die Membran wurde zunächst 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen, 20 Minuten in 0,2 M Natronlauge inkubiert und erneut 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Schließlich wurden der nächste Blockingschritt und ein weiterer Antikörpernachweis, wie oben beschrieben, durchgeführt.

2.2.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblot-Analyse von Gesamtproteinextrakten aus NZK-Gewebe

2.2.12.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Der Ablauf der SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen aus Gewebe unterscheidet sich nur in wenigen Punkten von der SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen aus Zellkulturen. In diesem Abschnitt werden nur die Unterschiede erläutert, der exakte Versuchsablauf ist Abschnitt 9.5.1 zu entnehmen.

Anstelle der Gelelektrophoresekammer Mini Protean Tetra System von Biorad wurde eine von der Werkstatt der Universitätsmedizin Mainz eigens für das Labor der Urologie hergestellte Gelelektrophoresekammer verwendet. Diese Gelkammer hat den Vorteil, dass die Gele größer und dicker sind, somit mehr Proben aufgetragen werden können und man bei der Probenmenge nicht auf 10 µl Auftragsvolumen beschränkt ist. Für diese Gelkammer wurde anstelle eines 10% igen Trenngels ein 7,5% iges Trenngel gegossen. Pro Tasche wurden 30 µl Probe (30 µg Protein) aufgetragen. Für den Gellauf wurden 600 ml 1x Laufpuffer benötigt. Bevor der Lauf gestartet wurde, musste darauf geachtet werden, dass sich keine Luftblasen am unteren Rand des Trenngels befanden, da diese den Stromfluss erheblich stören können. Die Luftblasen wurden mit Hilfe einer Spritze entfernt. Bei Verwendung dieser Gelelektrophorese-Kammer dauerte es etwa eine Stunde bis die Proteine das Trenngel erreichten und weitere 3-4 Stunden bis die Lauffront das Ende des Trenngels erreicht hatte und der Gellauf gestoppt werden konnte.

Die Erstellung von Boxplots aus den gemessenen Expressionen in den Gewebeproben erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS. Die Signifikanz wurde durch den Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Unterschiede wurden ab einem p-Wert < 0,05 als statistisch signifikant angesehen.

2.2.12.2 Westernblot-Analyse

Der Ablauf der Westernblot-Analyse von Proteinen aus Gewebe unterschied sich nur in der Inkubation mit dem Primärantikörper und einer Coomassie-Färbung von der Westernblot-Analyse von Proteinen aus Zellen. Auf Grund der Größe der Membranen war es nicht möglich sie in einem 50 ml Röhrchen auf einem Rollenmischer zu inkubieren. Die Membranen wurden in Schalen auf einem Inkubatiosschüttler über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Um die Gesamtmenge an aufgetragenem Protein nachzuweisen, wurden die Membranen nach den Antikörperfärbungen mit einer Coomassie-Blau Lösung eingefärbt. Coomassie färbt hierbei unspezifisch alle auf der Membran enthaltenen Proteine blau an. Die Membranen wurden über Nacht mit der Coomassie-Blau Lösung inkubiert, am Folgetag 2mal 10 Minuten mit Entfärbelösung gewaschen und schließlich getrocknet. Die Membranen wurden eingescannt und das eingefärbte Gesamtprotein mittels der Software *Image J* ausgemessen. Die Messwerte der Antikörperfärbungen wurden schließlich mit diesen Werten zur Normalisierung verrechnet.

2.2.13 Phospho-Kinase Array

Mit Hilfe des *Human Phospho-Kinase Array* Kits lassen sich die Aktivierungszustände von 46 intrazellulären Kinasen bestimmen. Der Test beruht auf Antikörperfärbungen gegen die phosphorylierten Formen verschiedener Kinasen. Da die hier untersuchten Kinasen durch Phosphorylierung aktiviert bzw. inaktiviert werden, ist dieser Nachweis ein Maß für ihr Aktivitätslevel. Die Primärantikörper gegen die 46 Phospho-Kinasen befinden sich in diesem Kit bereits auf Membranen, auf die die zu untersuchenden zellulären Proteinextrakte gegeben werden. Sekundäre biotinylierte Antikörper erkennen die Primärantikörper und gehen eine weitere Bindung mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin ein. Durch die Verwendung einer Substratlösung wird eine Chemiluminszenzreaktion hervorgerufen, die mit Hilfe des Detektionssystems Fluorchem E aufgenommen werden kann.

2.2.13.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus Zellkulturen für den Phospho-Kinase Array

Im Vorfeld der Proteinextraktion wurden $2x \ 10^6$ Zellen in eine Zellkulturschale (145mm) ausplattiert. Nach 48 Stunden Kultivierung bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Je nach Dauer der Inkubation mit den unterschiedlichen Substanzen wurde die Proteinextraktion am gleichen Tag oder am darauffolgenden Tag durchgeführt. Zur Herstellung der Extrakte wurde zunächst das Medium von den Zellen gesaugt und diese 3mal mit 10 ml eiskaltem 1x PBS gewaschen. Die Schale wurde sofort auf Eis gestellt und die Zellen mit 200 μ l Lysepuffer 6 (im Kit enthalten) pro Schale versetzt. Mit einem mit Ethanol (70%) gereinigten Zellschaber wurden die Zellen von der Schale abgelöst und mit einer Pipette in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Proben wurden für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Während diesem Inkubationsschritt wurden die

Extrakte mehrmals sanft gevortext. Die Proben wurden 5 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und anschließend die Proteine im Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration mit dem *BCA Protein Assay Reagent* Kit bestimmt (siehe Abschnitt 9.2). Die Proteinkonzentration wurde mit Lysepuffer 6 und *Array Buffer 1* auf 300 µg eingestellt.

2.2.13.2 Durchführung des Phospho-Kinase Arrays

Um unspezifische Bindungsstellen auf den im Kit enthaltenen Membranen zu blockieren, wurden diese zunächst mit Blocking-Lösung (Array Buffer 1) inkubiert. Hierzu wurden die Membranen mit Hilfe einer flachen Pinzette vorsichtig in 8-Well Platten gelegt, mit 1 ml Blocking-Lösung pro Membran überschichtet und 1 Stunde auf einem Inkubationsschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Die Blocking-Lösung wurde entfernt und durch die Proteinextrakte ersetzt. Es wurde pro Membran 1 ml mit 300 µg Protein auf die Membranen gegeben. Da die verschiedenen Antikörper auf zwei Membranen (A und B) verteilt waren, musste auf Membran A und B jeweils 1 ml Proteinextrakt gegeben werden. Die Bindung der Phospho-Kinasen an die Antikörper der Membranen erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Inkubatiosschüttler. Am Folgetag wurden die Membranen 3mal 10 Minuten mit 1x Waschpuffer gewaschen. Jede Membran wurde mit 1ml Antibody-Cocktail (A bzw. B) für 2 Stunden auf dem Schüttler inkubiert. Hierauf folgte ein 3maliges Waschen mit 1x Waschpuffer für je 10 Minuten. Im nächsten Schritt wurden die Membranen mit jeweils 1 ml Streptavidin-HRP-Lösung für 30 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 1x Waschpuffer (3mal 10 Minuten) wurde das Chemilumineszenzreagenz (ECL-Substanzen 1:1 verdünnt) gleichmäßig auf die Membranen aufgetropft. Nach einer 1minütigen Inkubationszeit wurden die Membranen in Klarsichtfolie gelegt. Die entstandenen positiven Signale wurden mit Hilfe des Detektionssystems Flurochem E visualisiert und aufgenommen. Die Signalstärke der Protein-Spots wurde mit der Software Image J am PC densitometrisch ausgewertet.

2.2.14 Zytotoxizitätstests

2.2.14.1 Zytotoxizitätstest mit MTT

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zytotoxizitätstest durchgeführt, um festzustellen, in welchem Maß eine Substanz die Stoffwechselaktivität von Zellen hemmt und somit toxisch auf die Zellen wirkt. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) ist

ein wasserlösliches, gelbes Tetrazoliumsalz. Inkubiert man Zellen mit MTT spaltet die mitochondriale Dehydrogenase dessen Tetrazoliumring. Diese Reaktion bringt einen wasserunlöslichen, blau-violetten Farbstoff (Formazan) hervor, dessen Menge photometrisch gemessen werden kann. Da diese Reaktion nur durch vitale Zellen hervorgerufen wird, ist die Intensität des Farbstoffs ein Maß für die Toxizität der Substanz.

Zur Vorbereitung des Zytotoxizitätstests mussten die zu untersuchenden Zellen in eine 96-Well Zellkulturplatte ausplattiert werden. Die Konzentration sollte hierbei 5x 10³ Zellen / 100 μ l für ein Well betragen. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen mit den entsprechenden Substanzen behandelt, deren Effekte auf die Stoffwechselaktivität der Zellen untersucht werden sollten. Da sich die Vorbehandlungsdauer der unterschiedlichen Substanzen unterscheidet, wurde der Zytotoxizitätstest noch am gleichen Tag oder erst am Folgetag durchgeführt. Jeder zu untersuchende Ansatz wurde 4fach bestimmt.

Am Versuchstag wurden zunächst 20 μ l einer 1% igen MTT-Lösung in jedes Well gegeben. Die Zellen wurden 3 Stunden mit MTT bei 37°C und 5% CO₂ abgedunkelt inkubiert. In dieser Zeit kam es zur Bildung des dunklen Formazans durch vitale Zellen. Die MTT-Lösung wurde von den Zellen dekantiert und ein Waschschritt mit 1x PBS folgte. Zum Lösen des wasserunlöslichen Farbstoffs aus den Zellen wurden pro Well 100 μ l Isopropanol dazugegeben. Die Zellkulturplatte wurde 15 Minuten kräftig geschüttelt (500 rpm auf dem Schüttler). Die Überstände wurden in eine neue 96-Well Zellkulturplatte überführt und im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570nm (Referenzwellenlänge 650nm) gemessen.

2.2.14.2 Zytotoxizitätstest mit Alamarblau

Eine weitere Möglichkeit die Toxizität von Substanzen auf Zellen zu untersuchen, ist die Verwendung von Alamarblau. Das in dieser Arbeit verwendete Alamarblau besteht aus Resazurin, einem Redoxindikator. Dieser wird von Zellen aufgenommen, zu Resorufin reduziert und verändert hierbei seine Farbe von blau nach rosa. Die Intensität dieses Farbumschlags kann photometrisch gemessen werden und korreliert mit der veränderten Vitalität der Zellen nach Behandlung mit den zu untersuchenden Substanzen.

Im Vorfeld des Versuchs mussten die zu untersuchenden Zellen in einer bestimmten Konzentration (5x 10³ Zellen in 100 μ l pro Well) in eine 96-Well Zellkulturplatte ausplattiert werden. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen mit den

entsprechenden Substanzen behandelt, deren Effekte auf die Stoffwechselaktivität der Zellen untersucht werden sollten. Da die Vorbehandlungsdauer mit den unterschiedlichen Substanzen variierte, wurde der Zytotoxizitätstest noch am gleichen Tag oder erst am Folgetag durchgeführt. Jeder zu untersuchende Ansatz wurde 4fach bestimmt.

Am Versuchstag wurde zunächst das Medium aus den Wells gegossen und diese einmal mit 1x PBS gewaschen. Das Alamarblau wurde als 10% ige Lösung in serum- und phenolrotfreiem Medium angesetzt und je 200 μ l pro Well pipettiert. Die Zellen wurden 4 Stunden mit der Alamarblau-Lösung bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. In dieser Zeit kam es zu einem Farbumschlag von blau nach rosa. Im Anschluss wurden pro Well 100 μ l des Überstandes in eine neue 96-Well Zellkulturplatte überführt und diese photometrisch im ELISA-Reader gemessen. Die Wellenlänge betrug hierbei 570nm, die Referenzwellenlänge 600nm.

2.2.14.3 Kristallviolett-Färbung

Parallel zu den Zytotoxizitätstests mit MTT und Alamarblau wurde auf einer zusätzlichen 96-Well-Zellkulturplatte immer eine Färbung mit Kristallviolett durchgeführt. Die Zellen dieser zusätzlichen Platte wurden identisch mit den zu untersuchenden Substanzen behandelt. Da Kristallviolett adhärente Zellen anfärbt und dieses photometrisch gemessen werden kann, konnte diese Färbung somit als Kontrolle dafür dienen, wie viele Zellen sich nach Behandlung noch in den Wells befanden. Die Zellen, die während der Behandlung mit den Substanzen abgestorben sind, wurden nicht gefärbt, da sie sich von der Platte lösen und vorher abgewaschen wurden. Eine verfälschte Abnahme der gemessenen Zellvitalität auf Grund einer Abnahme der Zelldichte in einem Well konnte somit aufgedeckt werden. Die Messung der Zytotoxizität mit MTT bzw. mit Alamarblau wurde immer mit der Kristallviolett-Färbung abgeglichen.

Die zu untersuchenden Zellen wurden parallel zu den Zellen für die Zytotoxizitätstests und in der gleichen Konzentration (5x 10³ Zellen in 100 μ l pro Well) in 96-Well Zellkulturplatten ausplattiert. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen entsprechend den Zellen für die Zytotoxizitätstests mit den zu untersuchenden Substanzen behandelt. Die Zellen wurden am gleichen Tag, zur gleichen Zeit mit Kristallviolett angefärbt, an dem auch die Zytotoxizitätstests durchgeführt wurden.

Zuerst wurde das Medium von den Zellen abgegossen und diese 2mal mit Waschpuffer gewaschen (100 µl pro Well). Der nächste Schritt diente dem Fixieren der Zellen. Hierfür wurden die Zellen 15 Minuten mit 100 µl pro Well 4% Paraformaldehyd inkubiert. Nach einem Waschschritt mit 1x PBS (100 µl pro Well) erfolgte die Färbung. Pro Well wurden 50 µl Kristallviolett-Lösung (0,5%) zu den Zellen gegeben und diese für 10 Minuten inkubiert. Die Platte wurde durch 3maliges Waschen mit Waschpuffer (100 µl pro Well) gründlich von der Kristallviolett-Lösung gesäubert und auf einem Tuch vollständig trocknen gelassen. Um den Farbstoff aus den Zellen zu lösen, wurden diese 30 Minuten mit 2% SDS inkubiert (100 µl pro Well). Die Überstände wurden schließlich in eine neue 96-Well Zellkulturplatte überführt und deren Absorption bei einer Wellenlänge von 550nm (Referenzwellenlänge 650nm) im ELISA-Reader gemessen.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss des Calcium-sensitiven Rezeptors und extrazellulären Calciums auf die organspezifische Metastasenbildung in Knochen

Da es sich bei Knochen um ein Calcium-reiches Gewebe handelt und der Calcium-sensitive Rezeptor in der gesunden Niere per se exprimiert wird, war es in dieser Arbeit von großem Interesse, diesbezüglich Zusammenhänge herzustellen und somit die Mechanismen einer organspezifischen Metastasenbildung in Knochen aufzuklären. Ziel der Untersuchungen in diesem Abschnitt war es, mögliche onkogene Eigenschaften des CaSR im NZK und dessen Einfluss auf die Bildung von Knochenmetastasen in Verbindung mit einer erhöhten Calcium-Konzentration aufzudecken. Es sollte gezeigt werden, ob der CaSR auch in malignem Nierenepithel exprimiert wird und ob das Ergebnis mit dem Ort der Metastasen der Patienten korreliert. Die Expression des CaSR wäre die Voraussetzung dafür, dass Tumorzellen aus diesem Gewebe in der Lage sind, die aus Knochen freigesetzten Calcium-Ionen zu detektieren. In weiteren Schritten sollte dargestellt werden, inwiefern extrazelluläres Calcium die Eigenschaften von Tumorzellen aus Nierenepithel beeinflusst, die eine Metastasenbildung begünstigen. Dies sollte durch mögliche intrazelluläre Veränderungen auf molekularer Ebene erklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der CaSR in gesundem und in Nierentumorgewebe mittels Real-Time PCR und Westernblot detektiert. Die NZK-Patienten, aus denen das Nierengewebe stammte, unterschieden sich darin, dass sie innerhalb von 5 Jahren nach Nephrektomie keine Metastasen, Lungen- oder Knochenmetastasen ausbildeten. Der CaSR wurde zudem in primären NZK-Zellen aus Patienten ohne, bzw. mit Lungen- oder Knochenmetastasen nachgewiesen. Hierbei sollte auch geklärt werden, ob extrazelluläres Calcium Einfluss auf die Regulation der Expression des CaSR nimmt. Im nächsten Schritt wurden funktionelle Tests unter Einfluss von erhöhtem extrazellulärem Calcium an diesen Zellen durchgeführt. Hierbei wurden besonders die Schritte untersucht, die zum Prozess der Metastasierung einen entscheidenden Beitrag leisten: Migration, Adhäsion und Proliferation. Mit Hilfe eines Phospho-Kinase-Arrays und weiteren Westernblot-Analysen sollten die molekularen Hintergründe der Effekte von Calcium auf die NZK-Zellen erklärt werden. Hierbei wurden nicht nur die durch Calcium hervorgerufenen Veränderungen berücksichtigt, Veränderungen, die sondern auch mögliche auf Grund des unterschiedlichen
Metastasierungspotenzials der NZK-Zellen bereits bestehen. Die molekularen Veränderungen sollten ebenfalls an dem zuvor untersuchten Normal- und Tumorgewebe aufgedeckt werden.

3.1.1 Expression der CaSR-mRNA in Gewebeproben von NZK-Patienten

Zur Untersuchung der *CaSR* mRNA-Expression wurde in einem Vorversuch zunächst Tumorund Normalgewebe von 3 NZK-Patienten untersucht. Einer dieser Patienten blieb frei von Metastasen, bei einem Patienten bildeten sich Lungenmetastasen, bei einem anderen bildeten sich Knochenmetastasen innerhalb von 5 Jahren nach Nephrektomie. Der CaSR wurde mittels PCR unter Verwendung spezifischer CaSR-Primer aus der cDNA von Gewebeproben dieser Patienten amplifiziert. Dies sollte erste Hinweise darüber geben, ob die *CaSR* mRNA in Abhängigkeit vom Ort der Metastasenbildung exprimiert wird.



Abbildung 3.1:

PCR zum Nachweis des CaSR in Normal- und Tumorgewebe von NZK-Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsorten.

Die Abbildung zeigt die auf einem Agarosegel aufgetrennten amplifizierten Fragmente. In Spur 1-6 wurden die mit CaSR-Primern amplifizierten Fragmente aufgetragen, in Spur 7 die Negativkontrolle und in den Spuren 8 und 9 die mit PDH-Primern amplifizierten Fragmente. Insgesamt wurden 3 Patienten ohne, mit Lungen- bzw. mit Knochenmetastasen untersucht (ein Patient pro Gruppe). In den Spuren 2, 4, 5, 6 befindet sich eine Bande zwischen der 100bp- und der 200bp-Markerbande, und somit der Größe von 141bp des erwarteten Amplifikats der *CaSR* mRNA entspricht.

Die *CaSR* mRNA konnte im Normalgewebe aus den Nieren aller Patienten nachgewiesen werden (Abbildung 3.1). Bei der Analyse des Tumorgewebes erschien nur in der Probe des Patienten mit Knochenmetastasen eine Bande, die jedoch eine geringere Intensität aufwies als

die Bande des Normalgewebes. In den Nierengewebeproben von Patienten ohne bzw. mit Lungenmetastasen konnte keine *CaSR* mRNA im Tumorgewebe nachgewiesen werden.

Um das Ergebnis dieses Vorversuches zu verifizieren und die Intensitätsunterschiede der Banden besser analysieren zu können, wurde in einem weiteren Versuch die *CaSR* mRNA in Gewebeproben von 33 NZK-Patienten mittels Real-Time PCR quantifiziert. Hierfür wurden wiederum Proben aus Tumor- und Normalgewebe untersucht. Die Patienten bildeten innerhalb von 5 Jahren nach Nephrektomie keine, Lungen- bzw. Knochenmetastasen aus (jeweils 11 Patienten), so dass die Ergebnisse mit dem Metastasierungsort verglichen werden konnten.



Abbildung 3.2:

Expression der *CaSR* mRNA in Normal- und Tumorgewebe von NZK-Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsorten, bestimmt durch quantitative Real-Time PCR.

In Abbildung A ist die Expression der *CaSR* mRNA in Normalgewebe dargestellt, Abbildung B zeigt die Expression in Tumorgewebe. Insgesamt wurden 33 Patienten ohne, mit Lungen- bzw. Knochenmetastasen untersucht (11 Patienten pro Gruppe). Die zentrale Linie der Boxplots stellt den Median dar. Es werden die 25. und die 75. Perzentile gezeigt (unterer und oberer Teil der Boxplots), sowie Minimum und Maximum (untere und obere Linie der Boxplots). Extremwerte werden nicht gezeigt. Die gemessenen Expressionen wurden mit der Expression des als Referenzgen dienenden TBP verrechnet.

Im Normal- und im Tumorgewebe korrelierte die Menge an *CaSR* mRNA mit dem Ort der Metastasenbildung (Abbildung 3.2). Im Normalgewebe von Patienten mit Lungenmetastasen lag die Expression 1,3fach erhöht vor, wiesen die Patienten Knochenmetastasen auf, wurde sogar die 2,3fache Menge gemessen, im Vergleich zu Patienten ohne Metastasen (Abbildung 3.2A). Im Tumorgewebe dieser Patienten war die Differenz der Menge an *CaSR* mRNA

wesentlich größer. Bei Patienten mit Lungenmetastasen war die Expression 2,8fach erhöht, bei Patienten mit Knochenmetastasen lag die *CaSR* mRNA sogar in der 10,8fachen Menge vor, im Vergleich zu Patienten ohne Metastasen (Abbildung 3.2B). Somit wiesen Patienten mit Knochenmetastasen die größte Menge an *CaSR* mRNA im gesunden und im Tumorgewebe auf. Im Vergleich zur Expression im gesunden Gewebe wurde in den Tumorgewebeproben von Patienten ohne bzw. mit Lungenmetastasen die *CaSR* mRNA generell in einer sehr geringen Menge exprimiert.

3.1.2 Expression des CaSR-Proteins in Gewebeproben von NZK-Patienten

Um nicht nur Aussagen über die *CaSR* mRNA-Expression machen zu können, sondern auch über das von ihr translatierte Protein, wurde mittels Westernblot die Expression des CaSR-Proteins analysiert. Hierzu wurden wiederum Normal- und Tumorgewebe von 30 NZK-Patienten untersucht, von denen jeweils 10 Patienten keine, Lungen- bzw. Knochenmetastasen innerhalb von 5 Jahren nach Nephrektomie ausbildeten.



Abbildung 3.3:

Expression des CaSR-Proteins in Normal- und Tumorgewebe von NZK-Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsorten, bestimmt mittels Westernblot-Analysen.

In Abbildung A ist die Expression des CaSR in Normalgewebe dargestellt, Abbildung B zeigt die CaSR-Expression in Tumorgewebe. Insgesamt wurden 30 Patienten ohne, mit Lungen- bzw. Knochenmetastasen untersucht (10 Patienten pro Gruppe). Die zentrale Linie der Boxplots stellt den Median dar. Es werden die 25. und die 75. Perzentile gezeigt (unterer und oberer Teil der Boxplots), sowie Minimum und Maximum (untere und obere Linie der Boxplots). Extremwerte werden nicht gezeigt. Die Proteinbanden wurden densitometrisch ausgewertet und die gemessenen Expressionen mit der Gesamtmenge an aufgetragenem Protein verrechnet. Mit Hilfe der Westernblot-Analyse wurde festgestellt, dass die Expression des CaSR-Proteins im Normal- und im Tumorgewebe ebenfalls mit dem Ort der Metastasenbildung korreliert und der CaSR am stärksten in den Proben von Patienten mit Knochenmetastasen exprimiert vorliegt (Abbildung 3.3). In den Proben aus gesundem Nierengewebe konnten jedoch nur leichte Expressionsunterschiede des CaSR in den 3 Patientengruppen festgestellt werden (Abbildung 3.3A). Bei Patienten mit Lungenmetastasen war die Expression im Vergleich zu Patienten ohne Metastasen 1,2fach erhöht, bei Patienten mit Knochenmetastasen war sie 1,3fach erhöht. Wie schon für die Expression der *CaSR* mRNA im Tumorgewebe festgestellt wurde, war auch hier die Differenz der Proteinexpression zwischen den Patientengruppen etwas deutlicher (Abbildung 3.3B). Patienten mit Lungenmetastasen wiesen eine 1,3fache Expressionserhöhung auf, Patienten mit Knochenmetastasen eine 1,5fache Erhöhung.

3.1.3 Nachweis des epithelialen Ursprungs der primären NZK-Zellen

Weitere Analysen wurden an primären NZK-Zellen durchgeführt. Um zu garantieren, dass es sich bei diesen aus Patienten gewonnenen Nierenkarzinomzellen um Zellen epithelialen Ursprungs handelt, mussten sie vor Durchführung weiterer Versuche immunzytochemisch gefärbt werden. Hierfür wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch gegen Cytokeratin 8 und 18 in Nierenepithelzellen bindet.

Im Vergleich zur bläulich gefärbten Kontrolle (Färbung ohne primären Antikörper), kam es bei der Färbung gegen Cytokeratin zur Bildung eines braunen Farbstoffs in den Zellen (Abbildungen 3.4-3.6). Durch diese Färbung konnte der epitheliale Ursprung von insgesamt 9 Zelllinien aus NZK-Patienten nachgewiesen werden. Jeweils 3 dieser Patienten entwickelten innerhalb von 5 Jahren nach Nephrektomie keine Metastasen bzw. Lungen- oder Knochenmetastasen. Bei den weiteren durchgeführten Versuchen mit primären NZK-Zellen, kamen ausschließlich diese hier positiv gefärbten Zellen zu Einsatz.



Abbildung 3.4:

Immunzytochemische Färbung zum Nachweis des epithelialen Ursprungs der primären NZK-Zellen von Patienten ohne Metastasen.

Die Aufnahmen der oberen Reihe zeigen die Kontrollen (Färbung ohne primären Antikörper), die Aufnahmen der unteren Reihe die dazugehörigen immunzytochemischen Färbungen gegen Cytokeratin pan. Es wurden Zellen von 3 verschiedenen Patienten angefärbt. Sie weisen eine bräunliche Färbung auf. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe einer Mikroskop-Kamera angefertigt.



Abbildung 3.5:

Immunzytochemische Färbung zum Nachweis des epithelialen Ursprungs der primären NZK-Zellen von Patienten mit Lungenmetastasen.

Die Aufnahmen der oberen Reihe zeigen die Kontrollen (Färbung ohne primären Antikörper), die Aufnahmen der unteren Reihe die dazugehörigen immunzytochemischen Färbungen gegen Cytokeratin pan. Es wurden Zellen von 3 verschiedenen Patienten angefärbt. Sie weisen eine bräunliche Färbung auf. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe einer Mikroskop-Kamera angefertigt.



Abbildung 3.6:

Immunzytochemische Färbung zum Nachweis des epithelialen Ursprungs der primären NZK-Zellen von Patienten mit Knochenmetastasen.

Die Aufnahmen der oberen Reihe zeigen die Kontrollen (Färbung ohne primären Antikörper), die Aufnahmen der unteren Reihe die dazugehörigen immunzytochemischen Färbungen gegen Cytokeratin pan. Es wurden Zellen von 3 verschiedenen Patienten angefärbt. Sie weisen eine bräunliche Färbung auf. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe einer Mikroskop-Kamera angefertigt.

3.1.4 Expression des CaSR-Proteins in primären NZK-Zellen mit unterschiedlichem

Metastasierungspotenzial

In der vorliegenden Arbeit sollte nicht nur die Expression des CaSR in NZK-Gewebeproben untersucht werden, sondern ebenfalls in NZK-Zellen. Hierbei wurden die Zellen verwendet, die in der vorausgegangenen immunzytochemischen Färbung positiv auf ihren epithelialen Ursprung hin getestet wurden. Es wurden jeweils 3 Zelllinien von Patienten ohne, mit Lungen- bzw. mit Knochenmetastasen verwendet. Die Analyse der CaSR-Expression stellte eine entscheidende Vorrausetzung für die anschließenden Versuche dar, in denen der Einfluss von extrazellulärem Calcium über den CaSR auf die Zellen untersucht werden sollte. Zudem sollte geklärt werden, ob eine erhöhte extrazelluläre Calcium-Konzentration zu Veränderungen in der CaSR-Expression führt.

Da der primäre Antikörper gegen den CaSR, der in den Westernblot-Analysen der Gewebeproben verwendet wurde, der Analyse Zellen kein bei der primären zufriedenstellendes hervorbrachte, wurde hier die Ergebnis CaSR-Expression durchflusszytometrisch ermittelt. Dies gewährleistete zudem, dass nur membranständige und damit potentiell aktive CaSR-Moleküle detektiert werden.



Abbildung 3.7:

CaSR-Expression in primären NZK-Zellen von Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsorten mit und ohne Calcium-Behandlung, durchflusszytometrisch detektiert.

Die Abbildung zeigt die Expression des CaSR in primären unbehandelten NZK-Zellen und NZK-Zellen nach 30minütiger Calcium-Behandlung (5 mM). Oberhalb der Balken sind die entsprechenden Histogramme der unbehandelten NZK-Zellen abgebildet. Insgesamt wurden 9 Zelllinien von Patienten ohne, mit Lungen- bzw. mit Knochenmetastasen (jeweils 3) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der CaSR-Expression in unbehandelten Zellen von Patienten ohne Metastasen (=nicht-metastasierend) und die Standardfehler.

Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse zeigte die gleiche Tendenz wie die Ergebnisse der Westernblot-Analysen der NZK-Gewebeproben. Im Vergleich zu nichtmetastasierenden Zellen, wiesen Zellen aus Patienten mit Metastasen eine deutliche Steigerung in der CaSR-Expression auf (Abbildung 3.7). In Zellen aus Patienten mit Lungenmetastasen kam es zu einer 100% igen Expressionssteigerung. In Zellen aus Patienten mit Knochenmetastasen war der CaSR noch stärker exprimiert. Hier war die Expression um 270% erhöht. Eine Behandlung der Zellen mit Calcium führte zu keiner wesentlichen Expressionsänderung des CaSR.

Nach der erfolgreichen Detektion des CaSR-Proteins in den NZK-Zellen, sollte in weiteren Versuchen der Einfluss einer veränderten extrazellulären Calcium-Konzentration, wie sie in Knochen vorgefunden wird, auf das Verhalten dieser Zellen untersucht werden. Hierbei wurden speziell Eigenschaften der Zellen untersucht, die für den Prozess einer erfolgreichen

Metastasenbildung in einem Sekundärorgan unerlässlich sind: Migration, Adhäsion und Proliferation.

3.1.5 Untersuchung des Migrationsverhaltens primärer NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial ohne Einfluss von Calcium

Da in den vorausgegangen Westernblot- und durchflusszytometrischen Analysen festgestellt werden konnte, dass die Organspezifität der Metastasenbildung mit der Expressionsstärke des CaSR korreliert, sollte nun mit Hilfe von funktionellen Tests der Einfluss einer veränderten extrazellulären Calcium-Konzentration auf die Eigenschaften primärer NZK-Zellen untersucht werden. Die Behandlung der Zellen mit Calcium ist in den folgenden Versuchen entscheidend, da in Knochen ein erhöhter Level an Calciumionen vorliegt, und dieser ausschlaggebend für eine spezifische Metastasierung in Knochen sein könnte. In den folgenden Versuchen wurden jeweils 3 NZK-Zelllinien von Patienten analysiert, die innerhalb von 5 Jahren nach Nephrektomie keine bzw. Lungen- oder Knochenmetastasen entwickelten.

Der erste Schritt einer Metastasierung beinhaltet das Loslösen der Tumorzellen aus dem Zellverband des Primärtumors mit anschließender Migration in Richtung Blutgefäßsystem. Zu diesem Zeitpunkt ist die Serumkonzentration an Calcium noch nicht durch osteolytische Metastasen erhöht. Die ersten metastasierenden Zellen müssen die Migration in Richtung Blutgefäßsystem somit ohne einen möglichen fördernden Effekt durch Calcium bewältigen. Um diesen Schritt nachzuvollziehen, wurde in einem ersten Versuch das chemotaktische Migrationsverhalten unbehandelter NZK-Zellen in einer Boyden-Kammer untersucht. Hierzu diente die Extrazellularmatrix-Komponente Fibronektin als Chemotaxin.

NZK-Zellen aus Patienten, bei denen es zur Bildung von Metastasen kam, besaßen im Vergleich zu nicht-metastasierten Zellen ein deutlich gesteigertes Potenzial zur chemotaktischen Migration (Abbildung 3.8). So konnte für Zellen aus Patienten mit Lungenmetastasen eine 3,4fache Steigerung der Migration gezählt werden. Viel deutlicher erhöht war jedoch die Migrationsfähigkeit der Zellen aus Patienten mit Knochenmetastasen. Die Anzahl der Zellen, die aktiv durch die Poren der Membran migrierten und ausgezählt werden konnten, war 13,5fach so hoch wie die Anzahl nicht-metastasierender Zellen.



Abbildung 3.8:

Chemotaktische Migration primärer NZK-Zellen von Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsorten unter Verwendung von Fibronektin als Chemotaxin in der Boyden-Kammer. Das Diagramm zeigt die chemotaktische Zellmigration in Abhängigkeit von Fibronektin (10 µg/ml). Insgesamt wurden 9 Zelllinien von Patienten ohne, mit Lungen- bzw. mit Knochenmetastasen (jeweils 3) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der Migration von Zellen der Patienten ohne Metastasen und die Standardfehler aus 3 unabhängigen Versuchen. Über den Balken sind Aufnahmen (4fache mikroskopische Vergrößerung) der dazugehörigen Wells mit den migrierten, violett angefärbten Zellen zu sehen.

3.1.6 Einfluss von extrazellulärem Calcium auf die Adhäsion primärer NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial

Gelangen Tumorzellen durch die Blutgefäße in das Kapillarbett eines Zielorgans, besteht der nächste Schritt der Metastasierung in der Adhäsion an das Endothel und im Eindringen der Tumorzellen in das subendotheliale Gewebe des Sekundärorgans. Entscheidend hierbei ist die Zusammensetzung dieses Gewebes aus verschiedenen Komponenten der EZM, welche einen positiven Effekt auf die Adhäsion und das Eindringen der Tumorzellen haben kann. Um die Adhäsionsfähigkeit der NZK-Zellen mit unterschiedlichen Metastasierungseigenschaften (nicht-metastasierend, Bildung von Lungen- bzw. Knochenmetastasen, jeweils 2 Zelllinien) zu untersuchen, wurde mit ihnen ein Adhäsionstest durchgeführt. Für diesen Adhäsionstest wurde eine 96-Well Platte mit folgenden EZM-Komponenten beschichtet: Fibronektin, Kollagen I und Kollagen IV. Je nach ihren Eigenschaften kam es zu einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Adhäsion an diese Bestandteile. Befinden sich Tumorzellen im Kapillarbett von Knochen, sind sie zudem einer erhöhten Calcium-Konzentration ausgesetzt. Um die Effekte von Calcium auf die Adhäsion der NZK-Zellen zu untersuchen, wurde der Adhäsionstest mit unbehandelten und mit Calcium-behandelten Zellen durchgeführt.

Zum Versuchsaufbau des Adhäsionstests muss vermerkt werden, dass die BSA-Beschichtung der Platte als Negativkontrolle dienen sollte. BSA blockiert alle Bindungsstellen, so dass Zellen nicht an die Platte adhärieren können. In geringem Maße kam es in den durchgeführten Versuchen zu einer Adhäsion der NZK-Zellen an das BSA in den Wells der Negativkontrolle. Hierbei handelt es sich jedoch um unspezifische Bindungen, die eher passiv, also nicht über spezifische Rezeptoren zustande kommt. Zunächst scheint es, dass nicht-metastasierende NZK-Zellen nicht in der Lage sind an die verwendeten EZM-Komponenten zu adhärieren, da die Werte sich nicht von denen der Negativkontrolle unterscheiden (Abbildung 3.9). Berücksichtigt man nun, dass in der Negativkontrolle adhärente Zellen nachgewiesen werden konnten, lässt sich für nicht-metastasierende Zellen aussagen, dass diese in geringem Maße ebenfalls unspezifisch an Fibronektin, Kollagen I und Kollagen IV adhärieren. Die Adhäsionsfähigkeit dieser NZK-Zellen konnte durch eine Behandlung mit Calcium nicht beeinflusst werden.



Abbildung 3.9:

Adhäsion der primären NZK-Zellen aus Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsorten an Komponente der Extrazellularmatrix mit und ohne Calcium-Behandlung.

Das Diagramm zeigt die Adhäsion primärer Zellen an verschiedene Bestandteile der Extrazellularmatrix: Fibronektin, Kollagen Typ I, Kollagen Typ IV. BSA diente als Negativkontrolle. Dargestellt ist die Adhäsion von unbehandelten Zellen und von Zellen die 30 Minuten mit 5 mM Calcium behandelt wurden. Insgesamt wurden 6 Zelllinien von Patienten ohne, mit Lungen- bzw. mit Knochenmetastasen (jeweils 2) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der Adhäsion der BSA-Negativkontrolle der zu der jeweiligen Patientengruppe gehörenden unbehandelten NZK-Zellen und die Standardfehler aus 3 unabhängigen Versuchen.

Im Vergleich zu nicht-metastasierenden NZK-Zellen waren die Zellen aus Patienten mit Lungenmetastasen deutlich stärker in der Lage über Fokalkontakte an Fibronektin und Kollagen I zu binden. Bei diesen Zellen kam es zu einer 2fachen (Fibronektin) bzw. 2,5fachen (Kollagen I) Steigerung der Adhäsion im Vergleich zur dazugehörigen BSA-Negativkontrolle (der Zellen von Patienten mit Lungenmetastasen). Nach einer Behandlung mit Calcium wurde diese Steigerung aufgehoben. Dagegen blieb die Adhäsion der Zellen von Patienten mit Knochenmetastasen auch nach einer Calcium-Behandlung unbeeinflusst. Diese Zellen zeigten das größte Potenzial Zellkontakte zu Fibronektin und Kollagen I auszubilden. Für Fibronektin konnte eine 6,3-6,9fach erhöhte Adhäsion gemessen werden, für Kollagen I war diese 7,8-8,1fach erhöht, im Vergleich zur dazugehörigen BSA-Negativkontrolle (der Zellen von Patienten mit Knochenmetastasen).

3.1.7 Einfluss von extrazellulärem Calcium auf das Migrationsverhalten primärer NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial

Im Laufe der Metastasierung kommt es nach erfolgreicher Adhäsion der Tumorzellen, zu einem erneuten Migrationsschritt. Die Tumorzellen müssen schließlich in das Gewebe des Sekundärorgans eindringen. Befinden sich die Zellen im Kapillarbett von Knochen, sind sie hier einer erhöhten Calcium-Konzentration ausgesetzt. In Abschnitt 3.1.5 konnte bereits gezeigt werden, dass Tumorzellen aus Patienten, die eine Metastasenbildung aufzeigten, ein erhöhtes Migrationspotenzial besitzen, wenn sie mit Fibronektin chemotaktisch angelockt wurden. In einem weiteren Chemotaxisversuch sollte nun untersucht werden, wie stark Zellen migratorisch auf Calcium reagieren. Hierzu wurden die NZK-Zellen mit Calcium als Chemotaxin in einer Boyden-Kammer angelockt.





Die Ergebnisse des Migrationstests mit Calcium als Chemotaxin entsprechen des in Abschnitt 3.1.5 dargestellten Tests mit Fibronektin als Chemotaxin. NZK-Zellen von Patienten mit Metastasen lassen sich wesentlich stärker von Calcium zur Migration anregen als nichtmetastasierende NZK-Zellen (Abbildung 3.10). Dies zeigt sich wiederum besonders deutlich für NZK-Zellen von Patienten, die Knochenmetastasen entwickelten. In diesem Test ist jedoch die Differenz zwischen den verwendeten Zelllinien größer. So wurde für NZK-Zellen aus Patienten mit Lungenmetastasen die 3,8fache Menge an Zellen gezählt, die durch die Membranporen migriert sind, für NZK-Zellen aus Patienten mit Knochenmetastasen war dies sogar die 19fache Menge. Bei den nicht-metastasierenden NZK-Zellen waren fast gar keine migrierten Zellen sichtbar. Diese Zellen waren also nicht in der Lage auf Calcium als Chemotaxin zu reagieren.

3.1.8 Einfluss von extrazellulärem Calcium auf das Proliferationsverhalten primärer NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial

Haben die Tumorzellen erfolgreich das Sekundärorgan erreicht und sind in das Gewebe eingedrungen, besteht der letzte Schritt der Metastasierung nun darin, dass sich die Tumorzellen durch Proliferation vermehren und einen neuen Tumorzellverband bilden. Bei diesem Schritt sind die Tumorzellen weiterhin einer erhöhten extrazellulären Calcium-Konzentration ausgesetzt. Die Zellproliferation unter Einfluss einer erhöhten Calcium-Konzentration sollte im nächsten Versuch mit Hilfe eines BrdU-Inkorporation Assays demonstriert werden. Hierzu wurden wie schon in den vorausgegangenen Versuchen jeweils 3 Zelllinien von Patienten ohne, mit Lungen- bzw. mit Knochenmetastasen verwendet.

Im Gegensatz zu NZK-Zellen aus Patienten ohne bzw. mit Lungenmetastasen reagierten die Zellen aus Patienten mit Knochenmetastasen auf eine erhöhte Calcium-Konzentration (Abbildung 3.11). Ihre Proliferationsfähigkeit steigerte sich in Abhängigkeit von der Calcium-Konzentration. So konnte bei einer Konzentration von 5 mM im Vergleich zu den dazugehörigen unbehandelten Zellen eine 100% ige Steigerung, bei einer Konzentration von 10 mM eine 130% ige Steigerung gemessen werden. Bei den nicht-metastasierenden Zellen kam es zu keiner Änderung des Proliferationsverhaltens. Die gemessene leichte Steigerung bei Zellen aus Patienten mit Lungenmetastasen ist mit Blick auf den Standardfehler zu vernachlässigen.



Abbildung 3.11:

Proliferationsfähigkeit der primären NZK-Zellen von Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsorten mit und ohne Calcium-Behandlung, gemessen mittels BrdU-Inkorporation.

Die Abbildung zeigt den Einfluss einer 30minütigen Behandlung mit Calcium in unterschiedlichen Konzentrationen (2,5 mM, 5 mM, 10 mM) auf die Zellproliferation und die Proliferation unbehandelter Zellen. Insgesamt wurden 9 Zelllinien von Patienten ohne, mit Lungen- bzw. mit Knochenmetastasen (jeweils 3) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der unbehandelten NZK-Zellen aus der dazugehörigen Patientengruppe und die Standardfehler aus 3 unabhängigen Versuchen.

Die Ergebnisse der funktionellen Tests zur Demonstration der einzelnen Schritte im Prozess der Metastasierung zeigen, dass eine veränderte Calcium-Konzentration vor allem Migration und Proliferation von NZK-Zellen begünstigen, die ein hohes Potenzial zur Bildung von Knochenmetastasen besitzen. Zudem weisen besonders die Zellen aus Patienten mit Knochenmetastasen eine generell erhöhte Migrations- und Adhäsionsfähigkeit auf. Um die molekularen Hintergründe aufzudecken, die zu diesem veränderten zellulären Verhalten führen, wurden in weiteren Untersuchungen verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege analysiert.

3.1.9 Molekulare Hintergründe einer organspezifischen Metastasierung: Analyse der Signaltransduktionswege in primären NZK-Zellen mittels Westernblot

Um das unterschiedliche zelluläre Verhalten von nicht-metastasierenden NZK-Zellen und NZK-Zellen aus Patienten mit Lungen- bzw. Knochenmetastasen besser verstehen zu können, sollten in den folgenden Untersuchungen die molekularen Hintergründe aufgedeckt werden. Hierzu wurden Proteinextrakte aus den NZK-Zellen (von Patienten ohne, mit Lungen- bzw. Knochenmetastasen, jeweils 3) mittels Westernblot analysiert. Es wurden verschiedene Proteine aus Signaltransduktionswegen untersucht, die an den oben beschriebenen Schritten der Metastasierung maßgeblich beteiligt sind: Integrin α 5, die phosphorylierten und damit

aktiven Formen von Shc, FAK, Erk, Akt, sowie PTEN und Nedd4.1. Ein Großteil dieser Signalmediatoren sind Komponenten der dem CaSR nachgeschalteten Signalkaskaden. Um festzustellen, welche intrazellulären Veränderungen ausgelöst werden, wenn NZK-Zellen in Calcium-reiches Knochengewebe gelangen, wurden zudem Proteinextrakte der NZK-Zellen untersucht, die zuvor einer Calcium-Behandlung unterzogen wurden.

Integrinen kommt eine bedeutende Rolle bei der gerichteten Zellmigration zu, da sie die Kontaktstelle zwischen extrazellulärer Matrix, intrazellulären Signalwegen und dem Zytoskelett bilden. In dieser Arbeit wurde die Expression der α 5-Integrine untersucht, da sie zusammen mit den β 1-Integrinen ein Heterodimer bilden, das spezifisch an Fibronektin bindet. Die Expression von Integrin α 5 war in NZK-Zellen von Patienten mit Knochenmetastasen deutlich erhöht (um 330%), im Vergleich zu nicht-metastasierenden NZK-Zellen (Abbildung 3.12). NZK-Zellen von Patienten mit Lungenmetastasen wiesen ebenfalls eine Expressions-Erhöhung auf, diese betrug jedoch nur 40%. Eine Calcium-Behandlung zeigte fast keinen Einfluss auf die Integrin α 5-Expression.

Das Adapterprotein Shc ist intrazellulär direkt den Integrinen nachgeschaltet und für die Aktivierung des MAPK-Signalwegs zuständig. Da Shc erst nach Phosphorylierung in den aktiven Zustand übergeht, wurde hier die Expression der phosphorylierten Form untersucht (phosphoShc, Phosphorylierung an Tyrosin (Tyr) 239 und 240). Im Gegensatz zur Integrin α5-Expression, phosphoShc in NZK-Zellen mit einem starken Metastasierungspotenzial nicht erhöht exprimiert (Abbildung 3.12). Im Vergleich zu nicht-metastasierenden Zellen wiesen metastasierende Zellen sogar eine bis zu 36% reduzierte Aktivität von Shc auf. Eine erhöhte Calcium-Konzentration löste in nicht-metastasierenden Zellen eine Reduktion der aktiven Form von Shc auf fast das Aktivitäts-Niveau in den metastasierenden Zellen aus (Reduktion auf 47% der Kontrolle).



Abbildung 3.12: Expression bzw. Aktivität verschiedener Signalmediatoren in primären NZK-Zellen von Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsorten mit und ohne Calcium-Behandlung, bestimmt in Westernblot-Analysen und mittels densitometrischer Auswertung der Proteinbanden.

Die Diagramme zeigen die Expression von Integrin α5, PTEN, Nedd4.1 und den Phosphorylierungsstatus von Shc (Tyr 239/240), FAK (Tyr 397), Erk (Thr 202/Tyr 204, Thr 185/Tyr 187), Akt (Ser 473) und Akt (Thr 308) mit und ohne 30minütiger Calcium-Behandlung (5 mM). Insgesamt wurden 9 Zelllinien von Patienten ohne, mit Lungen- bzw. mit Knochenmetastasen (jeweils 3) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der unbehandelten Zellen von Patienten ohne Metastasen und die Standardfehler. Die gemessenen Expressionen wurden mit der Gesamtmenge an aufgetragenem Protein verrechnet. Über den Balken sind die dazugehörigen Proteinbanden exemplarisch von jeweils einer Zelllinie dargestellt. Durch die Verrechnung mit Aktin kommen leichte Unterschiede zwischen den abgebildeten Banden und den Balken zustande.

Die Tyrosinkinase FAK ist, wie das Adapterprotein Shc, intrazellulär direkt den Integrinen nachgeschaltet und löst nach Aktivierung durch Phosphorylierung die MAPK-Kaskade aus. FAK nimmt jedoch nicht nur Einfluss auf den MAPK-Signalweg. Es kann zudem über Aktivierung der PI3-Kinase den Akt-Signalweg stimulieren. In dieser Analyse wurde wiederum die phosphorylierte, also aktive Form von FAK detektiert (phosphoFAK, Phosphorylierung an Tyrosin 397). Die Ergebnisse zeigen ein mit den α5-Integrinen vergleichbares Expressionsmuster. NZK-Zellen von Patienten mit Knochenmetastasen exprimieren am meisten phosphoFAK (Abbildung 3.12). Im Vergleich zu nichtmetastasierenden und in Lungen-metastasierenden NZK-Zellen, konnte hier eine deutliche Aktivitätssteigerung um 260% festgestellt werden. Desweiteren konnte durch die Behandlung mit Calcium eine leichte Aktivitätssteigerung in metastasierenden NZK-Zellen hervorgerufen werden. Im Vergleich zu den entsprechenden unbehandelten Zellen lag phosphoFAK hier um etwa 60-70% erhöht exprimiert vor.

Die MAP-Kinase Erk wird unter anderem durch Shc und FAK, aber auch durch den CaSR reguliert und beeinflusst über Genregulation zelluläre Prozesse wie Migration, Adhäsion und Proliferation. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auch für Erk das Expressionsmuster der phosphorylierten und somit aktivierten Form (phosphoErk, Phosphorylierung an Threonin (Thr) Thr 202, 185 und Tyrosin 204, 187). Das Expressionsmuster von phosphoErk korrelierte exakt mit dem von phosphoShc. Im Vergleich zu nicht-metastasierenden NZK-Zellen wiesen metastasierende NZK-Zellen eine deutliche Reduktion (auf etwa 40%) in der Aktivität von Erk auf (Abbildung 3.12). Auch hier exprimierten nicht-metastasierende NZK-Zellen nach Calcium-Behandlung deutlich weniger phosphoErk. Die detektierte Menge entsprach fast der Menge der NZK-Zellen mit einem erhöhten Metastasierungspotenzial (37% der Kontrolle). In den Zellen von Patienten mit Lungenmetastasen löste Calcium einen Rückgang der aktiven Form von Erk um 25% aus, in Zellen von Patienten mit den dazugehörigen unbehandelten NZK-Zellen.

Der Akt-Signalweg wird durch die PI3-Kinase reguliert, die wiederum durch FAK oder direkt von Wachstumsfaktor-Rezeptoren kontrolliert wird. Der Akt-Signalweg mündet in der Regulation von Migration und Proliferation. Die Aktivierung der Proteinkinase Akt kommt wie bei den bisher beschriebenen Proteinen durch Phosphorylierung zustande (phosphoAkt, Phosphorylierung an Serin (Ser) 473 und Threonin 308). Die Aktivität von Akt konnte deshalb ebenfalls durch Detektion der phosphorylierten Form gemessen werden. Die untersuchten NZK-Zellen zeigten für an Serin 473 phosphoryliertes Akt ein ähnliches Expressionsmuster wie bereits für die α 5-Integrine und phosphoFAK. NZK-Zellen mit einem hohen Metastasierungspotenzial exprimierten deutlich mehr aktiviertes Akt als nichtmetastasierende Zellen (Abbildung 3.12). In Zellen aus Patienten mit Lungenmetastasen wurde eine Aktivitätssteigerung von 340% gemessen, in Zellen aus Patienten mit Knochenmetastasen lag die Steigerung bei 530%. Eine Behandlung mit Calcium führte zu unterschiedlichen Effekten. Verglichen mit den jeweiligen unbehandelten Zellen minderte Calcium in Zellen von Patienten mit Lungenmetastasen die Akt-Aktivität um 140%, in Zellen von Patienten mit Knochenmetastasen steigerte Calcium die Akt-Aktivität um 80%. Das Phosphorylierungsmuster an Threonin 308 unterschied sich von dem an Serin 473. In diesem Fall wurde in Zellen von Patienten mit Lungenmetastasen die stärkste Expression gemessen (Steigerung um 80% im Vergleich zu nicht-metastasierenden Zellen). Dagegen war die Expressionsänderung, die durch Calcium hervorgerufen wurde, vergleichbar. Calcium reduzierte die Expression von phosphoAkt (Threonin 308) in Zellen von Patienten mit 50%) und erhöhte sich in Zellen Lungenmetastasen (um von Patienten mit Knochenmetastasen (um 25%), verglichen mit den dazugehörigen unbehandelten Zellen.

Der Tumorsuppressor PTEN agiert über seine Protein- und Lipidphosphastase-Aktivitäten als Inhibitor von FAK, Shc und Akt. Über diesen Wirkmechanismus greift PTEN negativ in die Regulation von Migration, Adhäsion und Proliferation ein. Im Vergleich zu nichtmetastasierenden NZK-Zellen lag die Expression von PTEN in metastasierenden NZK-Zellen um bis zu 55% reduziert vor (Abbildung 3.12). Die PTEN-Expression aller untersuchten NZK-Zellen zeigte eine Sensibilität für eine veränderte extrazelluläre Calcium-Konzentration. So konnten nach Calcium-Behandlung in nicht-metastasierenden NZK-Zellen lediglich 8% der ursprünglichen Proteinmenge detektiert werden. In metastasierenden NZK-Zellen war nach Calcium-Behandlung fast kein PTEN mehr detektierbar.

Für den proteasomalen Abbau von PTEN ist die Ubiquitin-Ligase Nedd4.1 verantwortlich. Das Expressionsmuster dieses Enzyms zeigte jedoch nur eine geringe Korrelation zu dem Expressionsmuster von PTEN. In NZK-Zellen aus Patienten mit Lungenmetastasen kam es zu einer Reduktion der Expression von Nedd4.1 auf 53% (Abbildung 3.12). Dagegen exprimierten die NZK-Zellen von Patienten mit Knochenmetastasen 39% mehr Nedd4.1 als nicht-metastasierende NZK-Zellen. Eine Calcium-Behandlung reduzierte die Nedd4.1Expression in allen NZK-Zellen um mehr als die Hälfte der Expression der unbehandelten Zellen.

3.1.10 Molekulare Hintergründe einer organspezifischen Metastasierung: Analyse der Signaltransduktionswege in primären NZK-Zellen mittels Kinase-Array

Durch die Westernblot-Analysen der Proteinextrakte aus NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungsverhalten kristallisierten sich bereits wichtige Signalmediatoren heraus, die an der Regulation der Metastasierung beteiligt sind und durch Calcium beeinflusst werden. Um nun noch weitere Signalwege aufzudecken, die zu einer erfolgreichen Metastasierung beitragen könnten, wurde ein phospho Kinase-Array durchgeführt. Der phospho Kinase-Array dient der Detektion der Phosphorylierungs- bzw. Aktivitätszustände verschiedener intrazellulärer Signalmoleküle, mehrheitlich von Kinasen. Das bereits vorliegende Ergebnis für Akt und Erk konnte durch den Kinase-Array bestätigt werden. Die Kinasen p38α MAPK und JNK, der Tranksriptionsfaktor c-Jun, die Phospholipase Cy-1 und das Adapterprotein Paxillin stellten sich für die vorliegende Arbeit ebenfalls als bedeutend heraus. Alle diese Signalmediatoren erhalten ihre Aktivität durch Phosphorylierung und sind in die CaSR-Signalkaskaden involviert. In diesem Versuch wurden die Proteine jeweils einer Zelllinie von Patienten ohne Metastasen und von Patienten mit Knochenmetastasen untersucht. Wie schon bei den Westernblot-Analysen, wurden auch im Kinase-Array die NZK-Zellen zuvor einer Calcium-Behandlung unterzogen, um Effekte zu detektieren, die von einem Calcium-reichen Milieu ausgelöst werden.

In metastasierenden NZK-Zellen zeigte die Aktivität der MAP-Kinase Erk eine Reduktion auf 32% im Vergleich zu nicht-metastasierenden NZK-Zellen (Abbildung 3.13). Das Aktivitätsniveau von Erk in nicht-metastasierenden Zellen pendelte sich nach Calcium-Behandlung auf das Niveau in metastasierenden Zellen ein. Dieses Ergebnis bestätigt die durch Westernblot-Analyse erhaltenen in Abschnitt 3.1.9 beschriebenen Daten.

Die p38α MAP-Kinase ist genauso wie Erk Teil der MAPK-Signalkaskasde, die Integrinen und dem CaSR nachgeschaltet ist. Die p38α MAP-Kinase greift ebenfalls über Genregulation in Zellmigration und –proliferation ein. Die phosphorylierte Form der p38α MAPK lag in beiden untersuchten NZK-Zelllinien etwa gleich stark exprimiert vor (Reduktion um 13% in metastasierenden Zellen) (Abbildung 3.13). Eine Calcium-Behandlung führte jedoch zu gegenläufigen Effekten. In nicht-metastasierenden NZK-Zellen sank die Kinase-Aktivität



durch Calcium auf 46%. In Zellen von Patienten mit Knochenmetastasen löste ein Calciumreiches Milieu eine Erhöhung der p38α MAPK-Aktivität um 40% aus.

Abbildung 3.13:

Phosphorylierungsstatus verschiedener intrazellulärer Signalmediatoren in primären NZK-Zellen von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen mit und ohne Calcium-Behandlung, analysiert mittels Phospho-Kinase-Array und densitometrischer Auswertung der Proteinbanden.

Dargestellt sind die Moleküle, für die nach Calcium-Behandlung abweichende Werte von denen in unbehandelten Zellen detektiert wurden. Die Diagramme zeigen den Phosphorylierungsstatus folgender Signalmediatoren: Erk (Thr 202/Tyr 204, Thr 185/Tyr 187), p38 α (Thr 180/Tyr 182), PLC γ -1 (Tyr 783), JNK (Thr 183/Tyr 185, Thr 221/Tyr 223), c-Jun (Ser 63), Paxillin (Tyr 118), Akt (Ser 473), Akt (Thr 308). Die Zellen wurden vor der Analyse 30 Minuten mit 5 mM Calcium behandelt. Es wurde jeweils eine Zelllinie von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen untersucht. Die Werte sind in Prozent der Expression in unbehandelten NZK-Zellen von Patienten ohne Metastasen dargestellt.

Ein weiteres dem CaSR nachgeschaltetes Enzym ist die Phospholipase C γ -1. Sie ist ebenfalls an der Regulation der Migration beteiligt. Für PLC γ -1 konnte ein ähnliches Aktivitätsmuster wie für p38 α MAPK detektiert werden. Sie war in den unterschiedlichen NZK-Zelllinien fast gleich stark aktiviert (Reduktion um 15% in metastasierenden Zellen). Durch eine CalciumBehandlung wurde die Aktivität von PLC γ -1 in nicht-metastasierenden Zellen um 18% reduziert, in Zellen von Patienten mit Knochenmetastasen wurde sie um 20% erhöht.

Bei JNK handelt es sich auch um eine Komponente der dem CaSR-nachgeschalteten MAPK-Signalkaskade. Über Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun ist JNK an der Regulation der Proliferation beteiligt. Im Gegensatz zu c-Jun war die Aktivität von JNK in metastasierenden NZK-Zellen um 19% reduziert, im Vergleich zu nicht metastasierenden Zellen. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen führte eine Behandlung mit Calcium in nichtmetastasierenden Zellen zu einer Reduktion der phosphorylierten Form von JNK (um 41%). In metastasierenden Zellen löste Calcium eine Expressionssteigerung aus. PhosphoJNK und phospho-c-Jun lagen im Vergleich zur Expression in unbehandelten Zellen um 33% gesteigert vor.

Paxillin ist ein Adapterprotein, welches vorrangig an Fokalkontakten mit der Extrazellularmatrix lokalisiert ist. Nach Phoshporylierung und damit Aktivierung durch JNK nimmt Paxillin ebenfalls Einfluss auf die Zellmigration. In metastasierenden NZK-Zellen lag Paxillin 29% weniger stark aktiviert vor als in nicht-metastsierenden NZK-Zellen. Durch eine veränderte Calcium-Konzentration konnte in metastasierenden NZK-Zellen jedoch ein höheres Paxillin-Aktivitätslevel erreicht werden. Es kam zu einer Steigerung der Expression von phosphoPaxillin um 39%.

Die Analyse der Proteinkinase Akt mittels Kinase-Array bestätigte die zuvor durch Westernblot erhaltenen, in Abschnitt 3.1.9 beschriebenen Ergebnisse. Die Aminosäure Serin 473 ist in metastasierenden NZK-Zellen zu fast 500% häufiger phosphoryliert als in nichtmetastasierenden NZK-Zellen. Nach Calcium-Behandlung kam es zu einer weiteren Erhöhung der Akt-Phosphorylierung in diesen Zellen um 150%. Im durchgeführten Kinase-Array wurde nicht nur die Phosphorylierungsstelle Serin 473 untersucht, sondern auch die Phosphorylierungsstelle Threonin 308. Der Phosphorylierungsstatus dieser Aminosäure zeigte keinen wesentlichen Unterschied zwischen den beiden NZK-Zelllinien. Eine Behandlung der Zellen mit Calcium führte aber auch in Bezug auf die Aminosäure Threonin308 zu einer deutlich häufigeren Phosphorylierung in metastasierenden NZK-Zellen (Steigerung um 43% im Vergleich zu unbehandelten Zellen). Die mit Hilfe von Westernblot und Kinase-Array aufgedeckten molekularen Hintergründe einer organspezifischen Metastasierung sollten nicht nur in kultivierten Zellen aus Patienten analysiert werden. Um einen noch direkteren Bezug zum Patienten herstellen zu können, wurden in dieser Arbeit die Signaltransduktionswege zusätzlich in gesundem Nieren- und Tumornierengewebe von NZK-Patienten mit unterschiedlichem Metastasierungstatus untersucht.

3.1.11 Molekulare Hintergründe einer organspezifischen Metastasierung: Analyse der Signaltransduktionswege in NZK-Gewebeproben mittels Westernblot

In den Abschnitten 3.1.1 und 3.1.2 wurde bereits beschrieben, dass die Organspezifität mit der Expressionsstärke des CaSR in Normal- und Tumornierengewebe von NZK-Patienten korreliert. Um weitere ebenfalls zu einer organspezifischen Bildung von Metastasen beitragende Signalwege zu identifizieren, wurden in den Gewebeproben folgende Proteine mittels Westernblot detektiert: Integrin $\alpha 5$, phosphoShc, phosphoFAK, phosphoErk, phosphoAkt, PTEN. Diese Proteine sind größtenteils Komponenten der CaSR-Signalkaskaden und wurden in Abschnitt 3.1.9 bereits in Extrakten der primären NZK-Zellen analysiert und bezüglich ihrer Funktion beschrieben. In den Analysen zeigten sich für diese Moleküle Abweichungen zwischen den Patientengruppen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial. Die nun untersuchten Gewebeproben stammten zu gleichen Teilen aus Patienten, die innerhalb von 5 Jahren nach Nephrektomie keine, Lungen- oder Knochenmetastasen ausbildeten (jeweils 10 Patienten). Da es sich um natives Gewebe handelte, konnte in dieser Untersuchung nicht, wie in den NZK-Zellen, der Einfluss einer veränderten extrazellulären Calcium-Konzentration analysiert werden.

Zunächst wurden die Signalmediatoren in normalem Nierengewebe der Patienten untersucht. Das Expressionsmuster der meisten in diesem Abschnitt analysierten Proteine ist vergleichbar mit dem Expressionsmuster, welches bereits für die primären NZK-Zellen dargestellt wurde. Die Expressionen von Integrin α 5, phosphoShc, phosphoAkt und PTEN in Nieren-Normalgewebe stimmten mit denen in NZK-Zellen überein, wohingegen die Expressionen von phosphoFAK und phosphoErk gegenläufig waren (Abbildung 3.14).

Im Normalgewebe von Patienten mit Metastasen lag eine höhere Menge an Integrin α 5 vor als in Gewebe von Patienten ohne Metastasen: 1,2fache bzw. 1,5fache Erhöhung in Patienten mit Lungen- bzw. mit Knochenmetastasen. Shc zeigte eine deutliche Aktivitätsreduktion in Gewebeproben von Patienten mit Lungenmetastasen um 32%, im Vergleich zu Patienten ohne Metastasen. Bildeten die Patienten Knochenmetastasen, blieb der Aktivitätsstatus von Shc unverändert. Entgegen der detektierten FAK-Aktivitätssteigerung in Zellen aus Patienten mit Knochenmetastasen, wurde im untersuchten Normalgewebe von Patienten mit Metastasen eine leichte Reduktion der Aktivität um 10-15% festgestellt, im Vergleich zu Patienten ohne Metastasen.



Abbildung 3.14:

Expression bzw. des Phosphorylierungsstatus verschiedener Signalmoleküle im Normalgewebe von NZK-Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsorten. bestimmt in Westernblot-Analysen und mittels densitometrischer Auswertung der Proteinbanden.

In den Boxplots sind Expression bzw. Phosphorylierungsstatus folgender Proteine dargestellt: Integrin α 5, phosphoShc (Tyr 239/240), phosphoFAK (Tyr 397), phosphoErk (Thr 202/Tyr 204, Thr 185/Tyr 187), phosphoAkt (Ser 473), PTEN. Insgesamt wurde das Normalgewebe von 30 Patienten untersucht (jeweils 10 Patienten ohne, mit Lungen- oder mit Knochenmetastasen). Die zentrale Linie der Boxplots stellt den Median dar. Es werden die 25. und die 75. Perzentile gezeigt (unterer und oberer Teil der Boxplots), sowie Minimum und Maximum (untere und obere Linie der Boxplots). Extremwerte werden nicht gezeigt. Nach densitometrischer Auswertung der Proteinbanden wurden die gemessenen Expressionen mit der Gesamtmenge an aufgetragenem Protein verrechnet. Das Expressionsmuster von phosphoryliertem Erk in Nierennormalgewebe war ebenfalls nicht mit dem in NZK-Zellen vergleichbar. In Patienten mit Metastasen wurde eine erhöhte Menge an phosphoErk detektiert, im Vergleich zu Patienten ohne Metastasen. Bei einer Ausbildung von Lungenmetastasen wurde eine 1,3fache Aktivitätssteigerung gemessen, bei einer Ausbildung von Knochenmetastasen eine 1,5fache Aktivitätssteigerung. Wie schon für die Aktivität von Akt in NZK-Zellen festgestellt wurde, kam es auch im Normalgewebe der NZK-Patienten mit Knochenmetastasen zu einer deutlichen Steigerung (1,9fach) im Vergleich zu Patienten ohne Metastasen. In Gewebe von Patienten mit Lungenmetastasen kam es lediglich zu einer 1,2fachen Akt-Aktivitätssteigerung. Die Expression von PTEN in Nierennormalgewebe von NZK-Patienten zeigte ebenfalls ein ähnliches Muster wie in NZK-Zellen. Im Vergleich zu Patienten ohne Metastasen wurde in Gewebe von Patienten mit Metastasen eine reduzierte PTEN-Expression festgestellt (Reduktion um 14% bzw. 19% bei Bildung von Lungen- bzw. Knochenmetastasen).

In weiteren Westernblot-Analysen wurden die Expressionen der zuvor beschriebenen Signalmediatoren im Tumornierengewebe der Patienten mit unterschiedlichem Metastasierungsstatus untersucht. Die Expressionsmuster von Integrin α 5, phosphoShc, phosphoAkt und PTEN in Tumorgewebe zeigten jeweils die gleiche Tendenz wie die Expressionen in den NZK-Zellen (Abbildung 3.15). Das Aktivitätsniveau von FAK und Erk in Tumorgewebe unterschied sich hingegen von dem in NZK-Zellen. Im Vergleich zur Analyse des Normalgewebes zeigten alle untersuchten Proteine ein ähnliches Expressionsbzw. Aktivitätsmuster, welches sich lediglich durch die Stärke der Ausprägung unterschied.

Integrin α 5 lag im Tumorgewebe von Patienten mit Metastasen 2,3fach (Lungenmetastasen) bzw. 2,9fach (Knochenmetastasen) erhöht exprimiert vor. Bezogen auf Patienten ohne Metastasen war diese Expressionserhöhung in Patienten mit Knochenmetastasen sogar signifikant (p < 0,001). Für die Aktivität von Shc konnte ein Rückgang in Gewebeproben von Patienten mit Metastasen verzeichnet werden. Dieser betrug bei Patienten mit Lungenmetastasen 34%, bei Patienten mit Knochenmetasten 43%. FAK wurde in Patienten mit Knochenmetastasen ebenfalls in seiner Aktivität reduziert. Die Kinase war hier nur noch zu 67% aktiv. In Patienten mit Lungenmetastasen blieb die Aktivität von FAK dagegen unverändert.



Abbildung 3.15:

Expression bzw. des Phosphorylierungsstatus verschiedener Signalmoleküle im Tumorgewebe von NZK-Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsorten, bestimmt in Westernblot-Analysen und mittels densitometrischer Auswertung der Proteinbanden.

In den Boxplots sind Expression bzw. Phosphorylierungsstatus folgender Proteine dargestellt: Integrin α 5, phosphoShc (Tyr 239/240), phosphoFAK (Tyr 397), phosphoErk (Thr 202/Tyr 204, Thr 185/Tyr 187), phosphoAkt (Ser 473), PTEN. Insgesamt wurde das Tumorgewebe von 30 Patienten untersucht (jeweils 10 Patienten ohne, mit Lungen- oder mit Knochenmetastasen). Die zentrale Linie der Boxplots stellt den Median dar. Es werden die 25. und die 75. Perzentile gezeigt (unterer und oberer Teil der Boxplots), sowie Minimum und Maximum (untere und obere Linie der Boxplots). Extremwerte werden nicht gezeigt. * p < 0,001. Nach densitometrischer Auswertung der Proteinbanden wurden die gemessenen Expressionen mit der Gesamtmenge an aufgetragenem Protein verrechnet.

Im Gegensatz zur Aktivität von Shc und FAK zeigte sich für Erk und Akt eine Aktivitätssteigerung im Tumorgewebe, wenn es zur Ausbildung von Metastasen kam. Die Menge an aktivem Erk war in Gewebe von Patienten mit Lungenmetastasen 1,6fach erhöht. In Knochenmetastasen Gewebe von Patienten mit kam es einer geringeren zu Aktivitätssteigerung (1,1fach erhöht) bezogen auf Patienten ohne Metastasen. Die Aktivitätssteigerung von Akt in Patienten mit Knochenmetastasen war dagegen deutlicher ausgeprägt (1,4fache Steigerung). In Tumorgewebe von Patienten mit Lungenmetastasen konnte in der Expression von phosphoryliertem Akt kein merklicher Unterschied zu Proben aus Patienten ohne Metastasen detektiert werden. Diese Tendenz zeigte sich auch für die Expression von PTEN. In Gewebeproben aus Patienten mit Lungenmetastasen wurde die gleiche Menge an PTEN detektiert wie in Proben aus Patienten ohne Metastasen. Bei einer Ausbildung von Knochenmetastasen war PTEN im Tumorgewebe nur noch zu 74% aktiv.

3.2 Beurteilung der Bedeutung des Calcium-sensitiven Rezeptors für die organspezifische Metastasenbildung durch Einsatz eines CaSR-Inhibitors

Die in Abschnitt 3.1 dargestellten Ergebnisse bezüglich der Rolle des CaSR und von Calcium bei der organspezifischen Bildung von Knochenmetastasen sollten weiterführenden Analysen überprüft werden. Es sollte beurteilt werden, ob Calcium über den CaSR auf die NZK-Zellen Einfluss nimmt und nicht über alternative Rezeptoren und Signalwege wirkt. Um dies herauszufinden, wurde der allosterische CaSR-Inhibitor NPS 2143 verwendet. Dieser Inhibitor gewährleistet eine Blockierung des CaSR und verhindert die Erkennung von extrazellulärem Calcium durch den CaSR. Behandelt man die NZK-Zellen nun zunächst mit dem CaSR-Inhibitor und anschließend mit Calcium, sollte sich zeigen, ob es zur Ausprägung ähnlicher Effekte wie in Abschnitt 3.1 kommt, oder ob diese Effekte nun unterdrückt werden. In den folgenden Versuchen musste zunächst mittels Zytotoxizitätstests überprüft werden, in welcher Konzentration der CaSR-Inhibitor für eine Behandlung der NZK-Zellen eingesetzt werden sollte. Anschließend wurden die Effekte des CaSR-Inhibitors alleine und in

Kombination mit dem CaSR-Aktivator Calcium auf die Zellmigration und –proliferation untersucht. Um die molekularen Zusammenhänge möglicher Effekte aufzudecken, wurden die Expressionen verschiedener Signalmediatoren unter dem Einfluss des Inhibitors mittels Westernblot analysiert.

3.2.1 Ermittlung einer geeigneten Konzentration des CaSR-Inhibitors NPS 2143 zur Behandlung der primären NZK-Zellen

In einem Vorversuch musste zunächst eine geeignete Konzentration ermittelt werden, in welcher die NZK-Zellen mit dem CaSR-Inhibitor NPS 2143 behandelt werden sollten. Bei Einsatz dieser Konzentration sollten in den NZK-Zellen Effekte hervorgerufen werden, die auf der einen Seite so stark sind, dass sie detektierbar sind, auf der anderen Seite aber nicht stark genug, um die Zelle schwer und irreversibel zu schädigen. Zur Ermittlung der geeigneten Konzentration wurde ein Zytotoxizitätstest durchgeführt. Mit Hilfe von diesem Test lässt sich nachweisen in welcher Konzentration eine bestimmte Substanz toxisch auf

Zellen wirkt und sie somit schädigt. Da in unserem Labor zwei etablierte Tests zur Messung der Zytotoxizität zur Verfügung stehen (MTT- und Alamarblautest), sollte zunächst ermittelt werden, welcher dieser Tests für primäre NZK-Zellen besser geeignet ist. Bei der Durchführung des MTT-Tests wird MTT von vitalen Zellen in einen blau-violetten, photometrisch messbaren Farbstoff umgesetzt. Alamarblau wird ebenfalls von vitalen Zellen umgesetzt, woraufhin es seine Farbe von blau nach rosa verändert. Beide Tests wurden jeweils nur mit einer Zelllinie von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen stichprobenartig durchgeführt, da es sich um einen Vorversuch handelte. Der eigentliche Zytotoxizitätstest mit dem geeigneteren Farbstoff wurde mit allen Zelllinien durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem Inhibitor NPS 2143 in aufsteigender Konzentration behandelt (0,5 μ M – 100 μ M).

3.2.1.1 Zwei Zytotoxizitätstests im Vergleich: MTT und Alamarblau

Der folgende Versuch diente der Ermittlung des Zytotoxizitätstests, der besser geeignet ist, einen möglichen toxischen Effekt des CaSR-Inhibitors auf die primären NZK-Zellen aufzudecken. Die Zytotoxizitätstests mit MTT und Alamarblau wurden parallel und unter identischen Versuchsbedingungen durchgeführt. Gleichzeitig zu dem jeweiligen Test wurde eine weitere Färbung mit Kristallviolett durchgeführt. Diese Färbung diente als Kontrolle dafür, wie viele Zellen sich tatsächlich in den Wells der Mikrotiterplatte befanden und zu einem Umsatz der Farbstoffe beitragen konnten. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass eine geringere Anzahl an Zellen für weniger Farbumschlag und somit eine Abnahme der Zellvitalität verantwortlich war.



Abbildung 3.16:

Vitalität primärer NZK-Zellen von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen nach Behandlung mit NPS 2143 bestimmt mittels MTT-Test, dargestellt im Säulendiagramm.

obere Diagramm zeigt die Zellvitalität nach Das einstündiger Behandlung mit NPS 2143 in aufsteigender Konzentration (0,5 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 100 µM). Im unteren Diagramm ist die Anzahl der mit Kristallviolett angefärbten, adhärenten Zellen nach einstündiger Behandlung mit NPS 2143 in aufsteigender Konzentration (0,5 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 100 µM) dargestellt. Es wurde jeweils eine Zelllinie von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der dazugehörigen unbehandelten NZK-Zellen und die Standardabweichung.



Abbildung 3.17:

Vitalität primärer NZK-Zellen von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen nach Behandlung mit NPS 2143 bestimmt mittels Alamarblau-Test, dargestellt im Säulendiagramm.

Das obere Diagramm zeigt die Zellvitalität nach einstündiger Behandlung mit NPS 2143 in aufsteigender Konzentration (0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 100 μ M). Im unteren Diagramm ist die Anzahl der mit Kristallviolett angefärbten, adhärenten Zellen nach einstündiger Behandlung mit NPS 2143 in aufsteigender Konzentration (0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 100 μ M) dargestellt. Es wurde jeweils eine Zelllinie von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der dazugehörigen unbehandelten NZK-Zellen und die Standardabweichung.



Abbildung 3.18:

Vergleich zweier Tests zum Nachweis der Vitalität primärer NZK-Zellen von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen nach Behandlung mit NPS 2143, dargestellt im Liniendiagramm. Die beiden oberen Diagramme zeigen die Vitalität nachgewiesen mittels Alamarblau-Test, in den beiden unteren Diagrammen ist die Vitalität nachgewiesen mittels MTT-Test dargestellt. Alle Diagramme enthalten Werte parallel durchgeführter Messungen nach Färbung mit Kristallviolett. Es wurde jeweils eine Zelllinie von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen untersucht. Die Zellen wurden für eine Stunde mit NPS 2143 in aufsteigender Konzentration (0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 100 μ M) behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der dazugehörigen unbehandelten NZK-Zellen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Zytotoxizitätstests unterschieden sich nicht wesentlich von einander (Abbildungen 3.16, 3.17 und 3.18). Während der Inhibitor mit steigender Konzentration bei Zellen von Patienten ohne Metastasen eine minimale Reduktion der Vitalität auslöste, blieb diese bei Zellen von Patienten mit Knochenmetastasen nahezu unberührt. Die Färbung mit Kristallviolett zeigte, dass die starke Vitalitätsabnahme in einer Konzentration von 100 µM einer Abnahme der Zellzahl einhergeht (Abbildung 3.18). Der deutlichste Unterschied zwischen den beiden Tests zeigte sich jedoch in der Standardabweichung. Bei Durchführung der Alamarblau-Färbung wurden deutlich größere Werte für die Standardabweichung erhalten als mit dem MTT-Test (Abbildungen 3.16 und 3.17). Ein weiterer Aspekt, der für die Durchführung des Zytotoxizitätstests mit MTT spricht, ist die kürzere Versuchsdauer. Die geeignete Konzentration des CaSR-Inhibitors für die folgenden Untersuchungen wurde aus diesen Gründen mit dem MTT-Test ermittelt.

3.2.1.2 Ermittlung einer geeigneten Konzentration des CaSR-Inhibitors NPS 2143 mittels Zytotoxizitätstest mit MTT

Bevor in weiteren Untersuchungen die Bedeutung des CaSR für die organspezifische Metastasierung durch Einsatz eines CaSR-Inhibitors überprüft werden konnte, musste eine geeignete Konzentration des Inhibitors NPS 2143 ausgetestet werden. In Abschnitt 3.2.1.1 stellte sich der Zytotoxizitätstest mit MTT als geeignete Methode heraus, um verschiedene Konzentrationen auszutesten. Jeweils 3 NZK-Zelllinien von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen wurden mit dem Inhibitor NPS 2143 in aufsteigender Konzentration behandelt. Auch in diesem Testdurchlauf wurde parallel zum MTT-Test eine Färbung mit Kristallviolett durchgeführt, um die Anzahl der Zellen in den Wells zu kontrollieren.



Abbildung 3.19:

Vitalität primärer NZK-Zellen von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen nach Behandlung mit NPS 2143 bestimmt mittels MTT-Test, dargestellt im Säulendiagramm.

Das obere Diagramm zeigt die Zellvitalität nach einstündiger Behandlung mit NPS 2143 in aufsteigender Konzentration (0,5 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 100 µM). Im unteren Diagramm ist die mit Kristallviolett angefärbten, Anzahl der adhärenten Zellen nach einstündiger Behandlung mit NPS 2143 in aufsteigender Konzentration (0,5 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 100 µM) dargestellt. Es wurden jeweils 3 Zelllinien von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen untersucht. Dargestellt sind die in Mittelwerte Prozent der dazugehörigen unbehandelten NZK-Zellen und die Standardfehler aus 3 unabhängigen Versuchen.



Abbildung 3.20:

Vitalität primärer NZK-Zellen von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen nach Behandlung mit NPS 2143 bestimmt mittels MTT-Test, dargestellt im Säulendiagramm.

Beide Diagramme zeigen die mittels MTT-Test quantifizierte Vitalität und die Werte der parallel dazu durchgeführten Messung der Färbung mit Kristallviolett. Es wurden jeweils 3 Zelllinien von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen untersucht. Die Zellen wurden für eine Stunde mit NPS 2143 in aufsteigender Konzentration (0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 100 μ M) behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der dazugehörigen unbehandelten NZK-Zellen aus 3 unabhängigen Versuchen.

Durch den MTT-Test konnte festgestellt werden, dass die Vitalität der untersuchten NZK-Zellen mit steigender Konzentration des Inhibitors abnahm (Abbildung 3.19 und 3.20). Bei einer Konzentration von 0,5 µM war die Zellvitalität noch nahezu unverändert. Ab einer Konzentration von 1 µM bis 10 µM NPS 2143 kam es zu einer stetigen Reduktion der Vitalität der Zellen aus Patienten ohne bzw. mit Metastasen. Bei Einsatz von 1 µM waren 89-90% der vorhandenen Zellen vital, bei 5 µM noch 70-78%, bei 10 µM sank die Anzahl vitaler NZK-Zellen schließlich auf 51% (keine Metastasen) bzw. 70% (Knochenmetastasen). Unter Einsatz des Inhibitors in einer Konzentration von 100 µM waren lediglich 9-11% der NZK-Zellen vital. Hierbei ist jedoch zu bemerken, dass sich unter Verwendung dieser Konzentration die Zellanzahl in den einzelnen Wells deutlich reduzierte (Abbildung 3.20). Über die Hälfte der ursprünglich ausplattierten NZK-Zellen löste sich durch die Behandlung aus den Wells und konnte somit nicht mehr zum Umsatz des Farbstoffs beitragen. Der verringerte Farbumschlag kam hier nicht nur durch eine reduzierte Vitalität, sondern auch durch fehlende Zellen zustande. Man sollte also annehmen, dass bei einer Konzentration von 100 µM die Reduktion der Zellvitalität pro überlebende Zelle nicht ganz so stark ausgeprägt ist, wie in diesem Test dargestellt. Ein Großteil der Zellen starb durch die Behandlung. Für die weiteren Untersuchungen wurde eine Inhibitor-Konzentration von 5 µM ausgewählt. Bei dieser Konzentration zeigte sich bereits ein Effekt auf das zelluläre Verhalten. Da die Zellanzahl nicht reduziert wurde, war der Einfluss jedoch nicht so stark, dass die Zellen ihn nicht überlebten und sich aus den Wells lösten. Zudem wich das Ausmaß der Vitalitätsreduktion untersuchten NZK-Zellen mit unterschiedlichem in den

Metastasierungsverhalten kaum voneinander ab. Dies gewährleistete die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen NZK-Zellen unter NPS-Behandlung in den folgenden Versuchen.

3.2.2 Migrationsverhalten primärer NZK-Zellen nach Behandlung mit dem CaSR-Inhibitor NPS 2143

In Abschnitt 3.1.7 konnte gezeigt werden, dass NZK-Zellen, die fähig sind in Kochen zu metastasieren und den CaSR erhöht exprimieren, unter Verwendung von Calcium als Chemotaxin ein verstärktes migratorisches Potenzial aufweisen. In dieser Untersuchung sollte nun überprüft werden, ob dem CaSR hierbei die entscheidende Rolle zukommt. Durch Verwendung des CaSR-Inhibitors NPS 2143 sollte dargestellt werden, inwiefern sich die Zellmigration ändert, wenn der CaSR blockiert wird und nicht mehr in der Lage ist Calcium zu erkennen. Diese Untersuchung sollte zeigen, ob Calcium als Chemotaxin über den CaSR auf das zelluläre Verhalten einwirkt oder ob es mögliche alternative Wege gibt, über die ein Einfluss von Calcium auf die NZK-Zellen zustande kommt. In Vorbereitung des folgenden Migrationsversuchs wurden jeweils 3 NZK-Zelllinien von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen zunächst mit Calcium oder mit dem CaSR-Inhibitor bzw. mit beiden in Kombination behandelt, um schließlich in der Boyden-Kammer chemotaktisch von Calcium angelockt zu werden.

Nach Behandlung der NZK-Zellen mit dem CaSR-Inhibitor NPS 2143 zeigten die Zellen ein verändertes Migrationsverhalten im Vergleich zum Versuch ohne Inhibitor in Abschnitt 3.1.7. Durch Blockieren des CaSR zeigten nicht-metastasierende NZK-Zellen eine 1,2fach verstärkte Migration (Abbildung 3.21). Eine Kombination aus CaSR-Inhibitor und Calcium führte zu einer 1,3fach erhöhten Migrationsbereitschaft. Diese Ergebnisse müssen jedoch mit Vorsicht betrachtet werden, da die Einzelwerte relativ weit auseinander lagen, was sich im hohen Standardfehler zeigt. In metastasierenden NZK-Zellen führte eine Blockierung des CaSR mit NPS 2143 zu einer signifikanten Hemmung der Migration (p < 0.001). Nur noch 19% der Zellen waren fähig durch die Poren der Membran in Richtung Calcium zu migrieren. Dieser Effekt konnte durch eine kombinierte Behandlung aus Inhibitor und Calcium teilweise aufgehoben werden. Hierbei wurde zunächst der CaSR durch eine 30minütige Inhibitor-Behandlung (NPS 2143 alleine) blockiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 30 Minuten mit dem Inhibitor und Calcium in Kombination behandelt. In diesem Fall migrierten wiederum 47% der NZK-Zellen. Eine Vorbehandlung der NZK-Zellen mit Calcium allein vor Durchführung des Versuchs hatte keinen Effekt auf die Migrationsfähigkeit. Die untersuchten



Zellen ließen sich im gleichen Maß von Calcium als Chemotaxin anlocken wie die unbehandelten Zellen.

Abbildung 3.21:

Chemotaktische Migration der primären NZK-Zellen von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen nach Calcium- und NPS-Behandlung unter Verwendung von Calcium als Chemotaxin in der Boyden-Kammer.

Das Diagramm zeigt die Zellmigration nach Behandlung mit 5 mM Calcium (30 Minuten), 5 μ M NPS 2143 (eine Stunde) bzw. Calcium und NPS2 143 in Kombination (erst 30-minütige Zugabe von NPS 2143 alleine, dann weitere 30 Minuten in Kombination mit Calcium). Als Chemotaxin wurde Calcium (10 mM) eingesetzt. Insgesamt wurden 6 Zelllinien von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen (jeweils 3) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der dazugehörigen unbehandelten Zellen und die Standardfehler aus 3 unabhängigen Versuchen. Über den Balken sind mikroskopische Aufnahmen (4fache Vergrößerung) der dazugehörigen Wells mit den migrierten, violett angefärbten Zellen zu sehen. * p < 0.001.

3.2.3 Proliferationsverhalten primärer NZK-Zellen nach Behandlung mit dem CaSR-Inhibitor NPS 2143

In den vorausgegangenen Versuchen konnte nicht nur ein positiver Effekt von Calcium auf die Migration von NZK-Zellen von Patienten mit Knochenmetastasen gezeigt werden. Es wurde ebenfalls nachgewiesen, dass Calcium eine erhöhte Proliferation dieser Zellen mit erhöhter CaSR-Expression auslöst (Abschnitt 3.1.8). In einem erneuten Proliferationsversuch wurden die NZK-Zellen zuvor mit dem CaSR-Inhibitor NPS 2143 behandelt und somit der CaSR in seiner Funktion blockiert. Dieser Versuch diente also der Darstellung des Proliferationsverhaltens ohne Einfluss von Calcium über den CaSR. Damit sollte gezeigt werden, ob Calcium ein verändertes Proliferationsverhalten der NZK-Zellen tatsächlich über Aktivierung des CaSR auslöst, oder ob alternative Wege in Betracht gezogen werden sollten.

Für diese Versuchsdurchführung wurden jeweils 3 NZK-Zelllinien von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen zunächst mit Calcium oder mit dem CaSR-Inhibitor bzw. mit beiden in Kombination behandelt. Die Proliferation wurde danach mittels BrdU-Inkorporation gemessen.

Wie schon in Abschnitt 3.1.8 beschrieben, führte auch in diesem Versuch eine Calcium-Behandlung zu einem Anstieg der Proliferation metastasierender NZK-Zellen (Abbildung 3.22). In nicht-metastasierenden NZK-Zellen führte Calcium zu einem leichten Rückgang der Proliferation um 7%. Eine Blockierung des CaSR mit NPS 2143 führte in allen verwendeten Zellen zu einem leichten Rückgang der Proliferation um 5%. Wurden Calcium und NPS 2143 in Kombination auf die Zellen gegeben, hatte dies unterschiedliche Effekte auf die NZK-Zellen. Die Zellen von Patienten ohne Metastasen proliferierten nur noch zu 81%. In Zellen von Patienten mit Knochenmetastasen wurde der proliferationsfördernde Effekt von Calcium durch den Inhibitor aufgehoben, das Maß an Proliferation glich exakt dem der Kontrolle.



Abbildung 3.22:

Proliferation der primären NZK-Zellen von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen nach Calcium- und NPS-Behandlung, bestimmt mittels BrdU-ELISA.

Das Diagramm zeigt die Zellproliferation nach Behandlung mit 5 mM Calcium (30 Minuten), 5 μ M NPS 2143 (eine Stunde) bzw. Calcium und NPS 2143 in Kombination (erst 30-minütige Zugabe von NPS 2143 alleine, dann weitere 30 Minuten in Kombination mit Calcium). Insgesamt wurden 6 Zelllinien von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen (jeweils 3) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der dazugehörigen unbehandelten Zellen und die Standardfehler aus 3 unabhängigen Versuchen.

3.2.4 Beteiligte Signaltransduktionswege in primären NZK-Zellen nach Behandlung mit dem CaSR-Inhibitor NPS 2143, analysiert mittels Westernblot

Um nun die durch den CaSR-Inhibitor ausgelösten Effekte auf die Migration und die Proliferation der NZK-Zellen erklären zu können, wurden nachfolgend Westernblot-Analysen durchgeführt. Es wurden Proteinextrakte aus jeweils 3 NZK-Zelllinien von Patienten ohne bzw. mit Lungen- oder mit Knochenmetastasen auf die Expression verschiedener Signalmediatoren hin untersucht, die entscheidend zur Regulation des Prozesses der Metastasierung beitragen. Hierzu zählen phosphoErk, phosphoAkt und PTEN. Bei diesen Proteinen konnte zuvor eine Expressionsänderung durch den Einfluss von extrazellulärem Calcium festgestellt werden. Eine einstündige Behandlung mit dem CaSR-Inhibitor NPS 2143 vor der Proteinextraktion sollte klären, ob eine Hemmung des CaSR diesen Expressionsänderungen entgegenwirken kann.

Eine Behandlung mit dem CaSR-Inhibitor NPS 2143 führte in NZK-Zellen aus Patienten mit Knochenmetastasen zu stärkeren Effekten in der Proteinexpression als in Zellen aus Patienten ohne Metastasen (Abbildung 3.23). Die Effekte die durch eine Blockierung des Rezeptors hervorgerufen wurden, konnten auch durch eine nachfolgende Erhöhung der extrazellulären Calcium-Konzentration nicht aufgehoben werden (erst Zugabe des Inhibitors, dann Behandlung mit Calcium). Mit Ausnahme von phosphoryliertem Erk (Aktivitätssteigerung um 46%) hatte der Inhibitor keinen Einfluss auf die Aktivität bzw. Expressionsstärke der einzelnen Moleküle in nicht-metastasierenden NZK-Zellen. Die Aktivitätszustände von Erk und Akt konnten durch Zugabe des CaSR-Inhibitors in Zellen aus Patienten mit Knochenmetastasen teilweise sehr stark reduziert werden. Im Fall von Erk waren nur noch 20% der aktiven Form nachweisbar. Die Aktivität von Akt wurde durch den Inhibitor um 22% (Phosphorylierung an Serin 473) bzw. um 31% (Phosphorylierung an Threonin 308) reduziert. Im Gegensatz zur vollständigen Reduktion des Tumorsuppressors PTEN durch Calcium, kam es nach Behandlung mit NPS 2143 in allen untersuchten Zellen zu kaum einer Veränderung der Expression von PTEN, im Vergleich zu unbehandelten NZK-Zellen.



Abbildung 3.23:

Expression bzw. Aktivität verschiedener Signalmediatoren in primären NZK-Zellen von Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsorten nach Behandlung mit dem CaSR-Inhibitor NPS 2143 und Calcium, bestimmt durch Westernblot-Analysen und densitometrischer Auswertung der Proteinbanden.

Die Diagramme zeigen den Phosphorylierungsstatus von Erk (Thr 202/Tyr 204, Thr 185/Tyr 187), Akt (Ser 473) und Akt (Thr 308) und die Expression von PTEN nach einstündiger Behandlung mit 5 μ M NPS 2143 und NPS 2143 in Kombination mit 5 mM Calcium (erst 30-minütige Zugabe von NPS 2143 alleine, dann weitere 30 Minuten in Kombination mit Calcium). Insgesamt wurden 6 Zelllinien von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen (jeweils 3) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der unbehandelten Zellen von Patienten ohne Metastasen und die Standardfehler. Die gemessenen Expressionen wurden mit der Gesamtmenge an aufgetragenem Protein verrechnet. Über den Balken sind die dazugehörigen Proteinbanden exemplarisch von jeweils einer Zelllinie dargestellt. Durch die Verrechnung mit Aktin kommen leichte Unterschiede zwischen den abgebildeten Banden und den Balken zustande.

3.3 Einfluss einer TKI-Therapie auf die organspezifische Metastasenbildung

Bei der Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms kommt die neue sogenannte Target-Therapie mit den Multikinaseinhibitoren Sunitinib, Sorafenib und Pazopanib zum Einsatz. Diese Kinaseinhibitoren blockieren verschiedene Tyrosinkinasen und ihre nachgeschalteten Signalwege. Somit kann die Tumorprogression unterbunden werden. In diesem Abschnitt sollte nun geklärt werden, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Therapeutika und der Behandlungserfolg der unterschiedlichen organspezifischen Lokalisation der NZK-Metastasen gibt. Zur Durchführung dieser Untersuchungen wurden große Mengen an NZK-Zellen benötigt. Da die Verfügbarkeit der primären NZK-Zellen limitiert ist, wurden für diese Versuche kontinuierliche NZK-Zellen herangezogen. Sie wurden so ausgewählt, dass ihre Metastasierungsfähigkeiten denen der primären NZK-Zellen entsprachen. Insgesamt wurden vier Zelllinien ausgewählt: Eine nicht-metastasierende, eine in Lungen metastasierende und zwei in Knochen metastasierende NZK-Zelllinien. Die Zelllinie A-498 diente als Beispiel für nicht-metastasierende NZK-Zellen, da sie aus NZK-Patienten ohne Metastasenbildung stammt. Sie besitzt keine Fähigkeit zur Metastasenbildung. Die Zelllinie 786-O stammt aus einem Patienten bei dem es zwar zur Bildung von Lungen- nicht jedoch von Knochenmetastasen kam. Sie besitzt somit ebenfalls keine Fähigkeit zur Bildung von Knochenmetastasen, hat jedoch ein erhöhtes Potenzial zur Lungenmetastasierung. A-498 und 786-O unterscheiden sich zudem darin, dass in der Zelllinie 786-O kein PTEN nachweisbar ist, die Zelllinie A-498 hingegen PTEN exprimiert. Die NZK-Zelllinien Dibo und RC-1 entstammen aus NZK-Patienten, bei denen es zur Entwicklung von Knochenmetastasen kam. Sie repräsentieren somit NZK-Zellen mit einem hohen Potenzial zur Bildung von Knochenmetastasen.

Da die in den vorherigen Abschnitten durchgeführten Untersuchungen zur Organspezifität der Knochenmetastasierung an primären NZK-Zellen durchgeführt wurden, mussten diese zunächst an den oben aufgeführten kontinuierlichen NZK-Zelllinien wiederholt werden. Dies war nötig, um zu überprüfen, ob die Ergebnisse einer TKI-Behandlung in dem nun folgenden Abschnitt auf die Ergebnisse zur Organspezifität übertragbar sind. Anschließend wurden die genannten NZK-Zelllinien einer TKI-Behandlung unterzogen und die für eine Metastasierung essentiellen Verhaltensmuster auf Veränderungen hin analysiert.

3.3.1 Überprüfung der erhaltenen Ergebnisse der primären NZK-Zellen an kontinuierlichen NZK-Zelllinien

Da der Einfluss einer TKI-Therapie an kontinuierlichen NZK-Zelllinien getestet werden sollte, musste zuvor untersucht werden, welches Expressions- und Verhaltensmuster diese Zelllinien in Bezug auf den CaSR und Calcium aufweisen. Dies war notwendig, um die erhaltenen Ergebnisse mit denen aus den vorigen Abschnitten vergleichen zu können. Daher wurden die in Abschnitt 3.1 durchgeführten Versuche an den kontinuierlichen NZK-Zelllinien wiederholt. Zunächst wurde die Expression des CaSR in den NZK-Zelllinien analysiert. In einem zweiten Schritt wurden das Migrations- und das Proliferationsverhalten der Zellen unter Einfluss einer erhöhten extrazellulären Calcium-Konzentration untersucht. Schließlich sollten auch hier die an diesen Zellfunktionen beteiligten Signaltransduktionswege mittels Westernblot-Analysen aufgeklärt werden. Alle nun folgenden Versuche wurden an den vier kontinuierlichen NZK-Zelllinien 786-O, A-498, Dibo und RC-1 unternommen.

3.3.1.1 Expression des CaSR-Proteins in kontinuierlichen NZK-Zelllinien mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial



Abbildung 3.24:

Expression des CaSR in konti-nuierlichen NZK-Zelllinien, bestimmt mittels Westernblot-Analysen und densitometrischer Auswertung der Proteinbanden.

Das Diagramm zeigt die Expression des CaSR in den NZK-Zelllinien A-498, 786-O, Dibo und RC-1. Dargestellt sind die gemessenen Expressionen, verrechnet mit der Gesamtmenge an aufgetragenem Protein. Über den Balken sind die dazugehörigen Proteinbanden dargestellt. Durch die Verrechnung mit Aktin kommen leichte Unterschiede zwischen den abgebildeten Banden und den Balken zustande.

Die CaSR-Expression in den kontinuierlichen NZK-Zelllinien wurde mittels Westernblot detektiert. Die untersuchten Zelllinien zeigten eine unterschiedliche Expression des CaSR (Abbildung 3.24). In Extrakten der NZK-Zelllinie 786-O mit hohem Potenzial zur Lungenmetastasierung konnte fast kein CaSR festgestellt werden. Dagegen war in der nichtmetastasierenden NZK-Zelllinie A-498 das CaSR-Protein vorhanden. Die beiden
metastasierenden NZK-Zelllinien Dibo und RC-1 exprimierten den CaSR auch in detektierbaren Mengen. Hierbei wurde der CaSR von Dibo am stärksten exprimiert.

3.3.1.2 Migrationsverhalten kontinuierlicher NZK-Zelllinien mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial

Zunächst wurde das chemotaktische Migrationsverhalten der NZK-Zelllinien ohne den Einfluss von Calcium in einer Boyden-Kammer untersucht. Hierzu diente die Extrazellularmatrix-Komponente Fibronektin als Chemotaxin.

Bei der Auswertung dieses Versuchs zeigte sich, dass die metastasierenden NZK-Zelllinien 786-O, Dibo und RC-1 am stärksten von Fibronektin angelockt werden konnten (Abbildung 3.25). Die meisten migrierten Zellen wurden hierbei für die Zelllinien Dibo und RC-1 ausgezählt. Verglichen mit der nicht-metastasierenden Zelllinie A-498 war die Migrationsfähigkeit der metastasierenden Zellen bei Verwendung von Fibronektin doppelt so hoch.



Abbildung 3.25: Chemotaktische Migration der kontinuierlichen NZK-Zelllinien unter Verwendung von Fibronektin als Chemotaxin in der Boyden-Kammer. Das Diagramm zeigt die Zellmigration der NZK-Zelllinien A-498, 786-O, Dibo und RC-1. Als Chemotaxin wurde Fibronektin (10 µg/ml) eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen. Über den Balken sind mikroskopische Aufnahmen (4fache Vergrößerung) der dazu gehörigen Wells mit den migrierten, violett angefärbten Zellen zu sehen.

Unter Verwendung von Calcium als Chemotaxin zeigte die in Lungen metastasierende Zelllinie 786-O im Vergleich zu den anderen Zelllinien das schwächste Migrationspotenzial (Abbildung 3.26). Es konnten fast keine migrierten Zellen gezählt werden. Die deutlichste Fähigkeit in Richtung Calcium zu migrieren zeigte Dibo, gefolgt von RC-1. Die Zelllinie A-498 zeigte eine nur halb so starke Migrationsfähigkeit im Vergleich zur Zelllinie Dibo.



Abbildung 3.26: Chemotaktische Migration der kontinuierlichen NZK-Zelllinien unter Verwendung von Calcium als Chemotaxin in der Boyden-Kammer. Das Diagramm zeigt die Zellmigration der NZK-Zelllinien A-498, 786-O, Dibo und RC-1. Als Chemotaxin wurde Calcium (10 mM) eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus 3 unabhängigen Versuchen. Über den Balken sind mikroskopische Aufnahmen (4fache Vergrößerung) der dazu gehörigen Wells mit den migrierten, violett angefärbten Zellen zu sehen.

3.3.1.3 Einfluss von extrazellulärem Calcium auf das Proliferationsverhalten

kontinuierlicher NZK-Zelllinien mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial

Calcium zeigte den stärksten proliferationsfördernden Effekt auf die Zelllinie Dibo (Abbildung 3.27). Die Proliferation dieser Zelllinie stieg in Abhängigkeit von der Calcium-Konzentration an. Bei einer Konzentration von 5 mM bzw. 10 mM kam es zu einer 3,1fachen bzw. 3,6fachen Steigerung der Zellproliferation. Die Zelllinie RC-1 zeigte ebenfalls eine Änderung des Proliferationsverhaltens, welche jedoch nicht so deutlich ausgeprägt war. Bei einer Behandlung mit Calcium in den Konzentrationen 2,5 mM und 10 mM kam es jeweils zu einer etwa 1,3fachen Erhöhung der Proliferationsrate. Auf die Zelllinien 786-O und A-498, die keine Fähigkeit zur Bildung von Knochenmetastasen besitzen, zeigte eine erhöhte extrazelluläre Calcium-Konzentration keinen messbaren Effekt.



Abbildung 3.27:

Proliferationsfähigkeit der kontinuierlichen NZK-Zelllinien nach Calcium-Behandlung, gemessen in einem BrdU-ELISA.

Die Abbildung zeigt den Einfluss einer 30minütigen Behandlung mit Calcium in unterschiedlichen Konzentrationen (2,5 mM, 5 mM, 10 mM) auf die Zellproliferation. Es wurden die NZK-Zelllinien A-498, 786-O, Dibo und RC-1 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der dazugehörigen unbehandelten NZK-Zellen und die Standardfehler aus 3 unabhängigen Versuchen.

3.3.1.4 Beteiligte Signaltransduktionswege in kontinuierlichen NZK-Zelllinien mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial bestimmt mittels Westernblot

Zur Aufklärung der Hintergründe des unterschiedlichen Verhaltensmusters der kontinuierlichen NZK-Zellen sollten in diesem Abschnitt die hieran beteiligten Signaltransduktionswege mittels Westernblot-Analysen aufgedeckt werden. Wie bereits in den vorausgegangen Tests wurden die NZK-Zelllinien 786-O, A-498, Dibo und RC-1 untersucht. Um den Effekt einer erhöhten extrazellulären Calcium-Konzentration berücksichtigen zu können, wurden die NZK-Zelllinien vor der Proteinextraktion 30 Minuten mit Calcium (5 mM) behandelt.

Für die primären NZK-Zellen und die Gewebeproben aus Patienten mit Lungen- bzw. mit Knochenmetastasen wurde bereits eine höhere Expression von Integrin α 5 festgestellt, als sie in Patienten ohne Metastasen vorlag (Abschnitte 3.1.9 und 3.1.11). Dieses Expressionsmuster zeigte sich ebenfalls für die kontinuierlichen NZK-Zelllinien (Abbildung 3.28). Im Vergleich zur nicht-metastasierenden Zelllinie A-498 lag die Integrin α5-Expression in Dibo und RC-1, die ein hohes Potenzial zur Bildung von Knochenmetastasen aufweisen, um etwa 80% erhöht vor. In der Zelllinie 786-O, die aus einem Patienten mit Lungenmetastasen kultiviert wurde, konnte 14% mehr Integrin α5 detektiert werden. Eine Calcium-Behandlung hatte bezüglich der Integrin α5-Expression lediglich einen Effekt auf A-498 Zellen, der in einer Reduktion der Expression um 70% resultierte.



Abbildung 3.28:

Expressionen bzw. Aktivität verschiedener Signalmediatoren in kontinuierlichen NZK-Zelllinie nach Calcium-Behandlung, bestimmt durch Westernblot-Analysen und densitometrische Auswertung.

Die Diagramme zeigen den Phosphorylierungsstatus von FAK (Tyr 397), Shc (Tyr 239/240), Erk (Thr 202/Tyr 204, Thr 185/Tyr 187), Akt (Ser 473) und die Expression von Integrin α 5 und PTEN nach 30minütiger Behandlung mit 5 mM Calcium und ohne Calcium-Behandlung. Es wurden die NZK-Zelllinien A-498, 786-O, Dibo und RC-1 untersucht. Dargestellt sind die gemessenen Expressionen, verrechnet mit der Gesamtmenge an aufgetragenem Protein. Über den Balken sind die dazugehörigen Proteinbanden dargestellt. Durch die Verrechnung mit Aktin kommen leichte Unterschiede zwischen den abgebildeten Banden und den Balken zustande.

Ein ähnliches Expressionsmuster zeigte sich für die den Integrinen nachgeschaltete fokale Adhäsionskinase. In metastasierenden Zellen war FAK stärker aktiv, verglichen mit den nicht-metastasierenden A-498 Zellen. In 786-O Zellen konnte die größte Menge an aktivem FAK nachgewiesen werden (360% mehr detektiertes Protein verglichen mit A-498), in der Zelllinie Dibo wurden 110% mehr phosphoFAK und in RC-1 240% mehr phosphoFAK nachgewiesen. Eine Calcium-Behandlung führte zu unterschiedlichen Effekt in Abhängigkeit vom Metastasierungsort. In Zellen aus Patienten mit Lungenmetastasen (786-O) kamen die Effekte in einer Reduzierung der phosphorylierten Form von FAK um 30% zum Ausdruck. Dagegen kam es in Zellen aus Patienten mit Knochenmetastasen (Dibo und RC-1) zu einer Aktivitätssteigerung von FAK um 140-170%, im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Aktivität von Shc blieb in den unterschiedlichen Zelllinien nahezu unverändert. RC-1 Zellen wiesen ein reduziert phosphoryliertes Shc auf (um 35% im Vergleich zu A-498). Calcium hatte keinen Effekt auf die Shc-Aktivität. Für Erk konnte ein ähnlicher Aktivitätszustand gemessen werden. Hier lag die Aktivitätsreduktion in der metastasierenden Zelllinie RC-1 jedoch bei 50% der Werte von A-498. Zudem förderte Calcium die Phosphorylierung der Kinase. In den Zelllinien A-498 und RC-1 lag Erk nach Calcium-Behandlung um 50% erhöht phosphoryliert vor, in 786-O und Dibo um etwa 15%, verglichen mit unbehandelten Zellen. In den Zellen aus Patienten mit Knochenmetastasen lag phosphoryliertes Akt verglichen mit A-498 zwar reduziert vor (um 70-80%), diese fehlende Aktivität konnte jedoch durch Zugabe von Calcium stark erhöht werden (um 150-160% im Vergleich zu unbehandelten Zellen). Die Expression von PTEN in den kontinuierlichen NZK-Zelllinien zeigte ein ähnliches Muster, wie es bereits in primären NZK-Zellen und Gewebeproben detektiert wurde. Im Vergleich zur den nicht-metastasierenden A-498 Zellen exprimieren Zellen mit erhöhtem Metastasierungspotenzial deutlich weniger PTEN. In Dibo lag die Expression um 35% reduziert vor, in RC-1 um 60%. Auch in diesen Zellen beeinflusste Calcium die PTEN-Expression, jedoch nicht so deutlich wie in den primären NZK-Zellen. In der Zelllinie A-498 lag die Reduktion bei 40%, in der Zellinie Dibo bei 25% und in RC-1 Zellen bei 40%, jeweils verglichen mit unbehandelten Zellen. Wie bereits in der Einleitung des Abschnitts 3.3 und in Abschnitt 2.1.10.3 beschrieben wurde, ist die Zelllinie 786-O PTEN negativ. Diese Aussage konnte in den hier durchgeführten Westernblot-Analysen bestätigt werden.

Durch die Untersuchungen an kontinuierlichen NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial konnte somit gezeigt werden, dass sie ähnliche Verhaltens- und Expressionsmuster wie primäre NZK-Zellen aufweisen. Aus diesem Grund wurden die Zelllinien 786-O, A-498, Dibo und RC-1 für die nachfolgenden Analysen unter Einsatz der Tyrosinkinaseinhibitoren herangezogen.

3.3.2 Einfluss einer TKI-Therapie auf das Verhalten kontinuierlicher NZK-Zelllinien mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial

Derzeit gehören die Tyrosinkinaseinhibitoren zu den bestmöglichen Therapieoptionen des metastasierenden NZK. Sie unterbinden die Signalweiterleitung verschiedener Tyrosinkinasen und hemmen somit Prozesse der Metastasierung wie Migration und Proliferation. In den folgenden Versuchen wurden die kontinuierlichen NZK-Zelllinien mit den TKI Sunitinib, Sorafenib und Pazopanib behandelt und nachfolgend auf ihre Proliferations- und Migrationsfähigkeiten hin getestet. Hierbei sollte darauf geachtet werden, ob NZK-Zellen mit erhöhtem Metastasierungspotenzial anders auf die verschiedenen Therapeutika reagieren als nicht-metastasierende NZK-Zellen. Zudem sollte die organspezifische Lokalisation der Metastasen des Patienten berücksichtigt werden, um beurteilen zu können, ob diese Information ebenfalls bei der Auswahl einer geeigneten Therapie einbezogen werden sollte. Ein Teil der nun folgenden Ergebnisse wurde im Rahmen zweier von mir betreuter Diplomarbeiten angefertigt (Khageh Hosseini, 2010; Maucher, 2012).

3.3.2.1 Effekte einer TKI-Behandlung auf das Migrationsverhalten der NZK-Zelllinien

Im Vorfeld des Migrationstests wurden die NZK-Zelllinien für 24 Stunden mit den TKI Sunitinib, Sorafenib und Pazopanib in den Konzentrationen 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M und 50 μ M behandelt. Als Chemotaxine wurden die EZM-Komponenten Fibronektin und Vitronektin in der Boyden-Kammer eingesetzt. In vorausgegangenen Versuchen wurden die Chemotaxine in unterschiedlichen Konzentrationen an den Zelllinien ausgetestet und die Varianten ausgewählt, die gut dafür geeignet waren die Zellen chemotaktisch anzulocken. Die NZK-Zelllinien 786-O, Dibo und RC-1 wurden mit Fibronektin in einer Konzentration von 10 μ g/ml angelockt, die NZK-Zelllinie A-498 mit Vitronektin in einer Konzentration von 50 μ g/ml.

Die Behandlungen mit Sunitinib und Sorafenib hatten einen deutlich stärkeren Effekt auf die Zellmigration als eine Behandlung mit Pazopanib (Abbildung 3.29). Pazopanib konnte die Anzahl der migrierenden Zellen lediglich auf ein Minimum von 65%-85% reduzieren (Abbildung 3.29 C). Dies war auch erst in einer Konzentration von 50µM der Fall. Die Mehrzahl der Zellen konnte Pazopanib nicht in ihrer Migrationsfähigkeit beeinflussen. Bei den Zelllinien A-498 und Dibo konnte Sunitinib die Anzahl der migrierenden Zellen zwar ebenfalls nur auf etwa 80% reduzieren, dagegen wirkte es stärker auf 786-O und RC-1



(Abbildung 3.29 A). Hier kam es zu einer Hemmung der Migration um 50% (786-O) bzw. um etwa 80% (RC-1).



Die Abbildung zeigt den Verlauf der Migration unter dem Einfluss von TKI in unterschiedlichen Konzentrationen (1 µM, 5 µM, 10 µM, 50 µM). Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den TKI behandelt. Es wurden die NZK-Zelllinien A-498, 786-O, Dibo und RC-1 untersucht. Fibronektin $(10 \, \mu g/ml)$ und Vitronektin (50 µg/ml) dienten als Chemotaxine. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der dazugehörigen unbehandelten Zellen und die Standardabweichung aus einem Versuch.

Sorafenib zeigte eine noch stärkere Hemmung der Zellmigration (Abbildung 3.29 C). Die Migration der Zelllinien A-498 und Dibo wurde bei Behandlung mit 10 μ M um etwa 80% reduziert. 786-O und RC-1 zeigten schon bei einer Konzentration von 5 μ M keine Fähigkeit zur Migration mehr. Somit konnte mit den hier verwendeten Konzentrationen ausschließlich durch Sorafenib ein vollständiger Migrationsstopp erreicht werden. Zu bemerken ist, dass eine Behandlung mit Sunitinib in der Zelllinie 786-O zunächst eine Migrationssteigerung um 45% auslöste (bei einer Konzentration von 1 μ M). Dieser Effekt zeigte sich für A-498 bei Behandlung mit allen TKI in Konzentrationen von 1 bzw. 5 μ M. Die Migrationsfähigkeit der Zellen lag um 9-18% erhöht vor.

3.3.2.2 Effekte einer TKI-Behandlung auf das Proliferationsverhalten der NZK-Zelllinien

Im Vorfeld der Untersuchung der Proliferation mit Hilfe von BrdU-Inkorporation wurden die NZK-Zelllinien für 24 Stunden mit den TKI Sunitinib, Sorafenib und Pazopanib in den Konzentrationen 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M und 50 μ M behandelt.



In Bezug auf die Proliferation konnte durch eine Behandlung mit TKI in den verwendeten Konzentrationen keine vollständige Hemmung erzielt werden (Abbildung 3.30). Die schwächste anti-proliferative Wirkung zeigte Sunitinib (Abbildung 3.30 A). Die Proliferationsrate der Zelllinien 786-O, A-498 und Dibo wurde auf 55-75% gesenkt. Die Zelllinie RC-1 wurde in ihrer Proliferation nicht gehemmt, sondern leicht gefördert. Eine Behandlung mit Sorafenib reduzierte die Zellproliferation auf 39-64%, wobei die Zelllinie A-

498 am stärksten beeinflusst wurde (Abbildung 3.30 B). Die Proliferation der Zelllinie 786-O konnte durch Pazopanib zwar auf 32% reduziert werden, dagegen das lag Proliferationsminimum der anderen Zelllinien nach Pazopanib-Behandlung bei lediglich 65-68% (Abbildung 3.30 C). Auch im Fall der TKI-Effekte auf die Proliferation ist anzumerken, NZK-Zellen zunächst in ihrer dass einige Fähigkeit gefördert wurden. Die Proliferationssteigerung konnte am deutlichsten nach Sorafenib-Behandlung in den Zelllinien A-498 und Dibo beobachtet werden (Steigerung um bis zu 37%).

4. Diskussion

4.1 Knochen-spezifische Metastasierung des NZK

Obwohl bereits viele Mechanismen aufgedeckt wurden, die zu einer Bildung von Metastasen führen, sind die Hintergründe für eine organspezifische Metastasierung noch relativ unklar. Es wird diskutiert, ob die charakteristische Ausstattung einer Tumorzelle ihr metastatisches Verhalten und somit die Lokalisation der Metastase bestimmt. Hierbei können intrazelluläre Eigenschaften sowie die Beschaffenheit der Zelloberfläche von Bedeutung sein (Nguyen et al., 2009; Psaila und Lyden, 2009). Migration, Adhäsion und Proliferation fördern das metastatische Verhalten von Tumorzellen und stellen damit entscheidende Schritte im Prozess der Metastasierung dar. Sowohl bei der Intravasation aus dem Primärtumor in das Blutgefäßsystem als auch bei der Extravasation in das sekundäre Organ und Bildung eines neuen Zellverbandes benötigen Tumorzellen diese Fähigkeiten. Des Weiteren wird diskutiert, ob das in den Organen vorherrschende Mikromilieu entscheidend für die Lokalisation der Metastasen ist. Bestimmte Bedingungen im Sekundärorgan können positiven Einfluss auf die metastasierenden Tumorzellen nehmen (Paget, 1989; Fidler, 2001). Knochengewebe zeichnet sich durch ein definiertes Mikromilieu aus. Von anderen Organen unterscheidet es sich insbesondere durch die hohe Konzentration an Calcium, bedingt durch den permanenten Aufund Abbau der Knochen. Calcium könnte im Knochenmilieu somit Bedingungen schaffen, die von metastasierenden NZK-Zellen bevorzugt werden und ausschlaggebend für die hohe Frequenz an NZK-Knochenmetastasen sind. Bevor Tumorzellen in das mit Calcium angereicherte Mikromilieu gelangen, stehen sie jedoch noch nicht unter dessen Einfluss. Die Knochenspezifität metastasierender NZK-Zellen muss daher unter Calcium-abhängigen und Calcium-unabhängigen Aspekten betrachtet werden.

4.2 Extrazelluläres Calcium und der Calcium-sensitive Rezeptor begünstigen die NZK-Metastasierung in Knochen

4.2.1 Eine hohe Expression des CaSR korreliert mit der NZK-Metastasierung in Knochen

Extrazelluläres Calcium wird von den Zellen über den CaSR wahrgenommen. Da dem CaSR eine physiologische Funktion in der Niere zukommt und er in diesem Organ exprimiert ist, sind Nierenepithelzellen, die Vorläuferzellen des NZK, per se sensitiv für Calcium. Somit wäre die Hauptvoraussetzung gegeben, dass Calcium und dem CaSR bei der Knochenmetastasierung des NZK eine entscheidende Rolle zukommt. Dies ist jedoch nur von Bedeutung, wenn die Expression des CaSR während der Tumorgenese des NZK erhalten bleibt. Bei malignen Transformationen kommt es jedoch häufig zur Dysregulation von Genexpressionen. Hiervon könnte auch die Expression des CaSR betroffen sein. Aus diesem Grund wurde in den ersten Untersuchungen der vorliegenden Dissertation die CaSR-Expression in nativem Tumor- und gesundem Nierengewebe von NZK-Patienten analysiert um sein Vorhandensein zu überprüfen.

Tabelle 4.1:

Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressionsanalysen des CaSR in NZK-Gewebeproben und primären NZK-Zellen.

Die Tabelle zeigt die Expression des CaSR in Normal- und Tumorgewebe von NZK-Patienten und primären NZK-Zellen mit unterschiedlichen Metastasierungsorten. Zeichenerklärung: 0 = keine Expression, + = schwache Expression, + + = mittlere Expression, + + = starke Expression, + + + = sehr starke Expression.

CaSR mRNA	Normal- gewebe	Tumor- gewebe	CaSR Protein	Normal- gewebe	Tumor- gewebe	NZK- Zellen
keine Metastasen	+	0	keine Metastasen	+	+	+
Lungenmetastasen	++	0	Lungenmetastasen	++	++	++
Knochenmetastasen	++++	+++	Knochenmetastasen	++	+++	++++

Es zeigte sich, dass der CaSR in Proben von Patienten, die innerhalb von 5 Jahren nach Nephrektomie Knochenmetastasen entwickelten, deutlich höher exprimiert war als in Proben von Patienten mit Lungenmetastasen oder ohne Metastasen (Tabelle 4.1). Eine hohe CaSR-Expression korrelierte also mit der spezifischen Bildung von NZK-Metastasen in Knochen. Dieses Ergebnis gibt einen ersten Hinweis darauf, dass Calcium in der Knochenmetastasierung des NZK eine Rolle zukommt. Bereits in gesundem Nierenepithel bestanden entsprechende Unterschiede in der CaSR-Expression in den Patientengeweben mit unterschiedlichem Metastasierungsstatus. Dies deutet darauf hin, dass bestimmte Epithelzellen bereits vor der malignen Transformation dazu prädestiniert sind, verstärkt auf Calcium anzusprechen. Verändern sich gesunde Zellen aus Nierenepithel mit erhöhter CaSR-Expression im Laufe der Kanzerogenese zu metastasierenden Tumorzellen, können diese verstärkt von Calcium beeinflusst werden, wenn sie in das Calcium-reiche Milieu des Knochens gelangen. Bezüglich dieser Annahme wäre schon in der gesunden Niere festgelegt, ob es während der Kanzerogenese zur Ausbildung von Knochenmetastasen kommt. Es darf jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Expressionsunterschiede erst durch Anwesenheit eines Primärtumors in der Niere induziert wurden. Unabhängig von Ursache und Wirkung könnte der CaSR, wie bereits für andere Tumorentitäten gezeigt (Mihai, 2008; Saidak et al., 2009a), ein prognostischer Marker für die NZK-Knochenmetastasierung sein. Um diese These zu prüfen, wurden weitere Expressionsanalysen des CaSR an primären NZK-Zellen durchgeführt, die aus Patienten mit unterschiedlichem Metastasierungsstatus kultiviert wurden.

Durch Detektion des CaSR in primären NZK-Zellen von Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsorten konnten die in den Expressionsanalysen der Gewebeproben erzielten Ergebnisse bestätigt werden. In NZK-Zellen zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster wie in den Gewebeproben. NZK-Zellen aus Patienten mit Knochenmetastasen exprimierten den CaSR wesentlich stärker als nicht-metastasierende Zellen (Tabelle 4.1). Dieses Ergebnis bildet die Voraussetzung dafür, dass bestimmte primäre NZK-Zellen mit Hilfe des CaSR extrazelluläres Calcium detektieren, in ein Signal umwandeln und in die Zelle weiterleiten können.

Um die Hintergründe der unterschiedlich starken Expression des CaSR aufzuklären, wurde der Einfluss von Calcium auf die CaSR-Expression untersucht. Hierdurch sollten mögliche Regulationsmechanismen aufgedeckt werden, die durch seinen aktivierenden Liganden ausgelöst werden könnten.

4.2.2 Extrazelluläres Calcium ist kein Regulator der CaSR-Expression im NZK

Wurden die NZK-Zellen einer erhöhten extrazellulären Calcium-Konzentration ausgesetzt, führte dies nicht zu einer Veränderung in der CaSR-Expression. Extrazelluläres Calcium nimmt keinen Einfluss auf die CaSR-Expression und kann daher als Regulator vermutliche ausgeschlossen werden. Zur durchgeführten Analyse muss jedoch erwähnt werden, dass eine 30minütige Vorbehandlung mit Calcium vielleicht nicht ausreichend lang war, um einen Effekt in der transkriptionellen Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche erkennen zu können. Es könnte sein, dass der Prozess der Genexpression und die gezielte Lokalisation in der Zelle in dieser Zeit nicht vollständig abgeschlossen werden konnte. Da die Analyse durchgeführt durchflusszytometrisch wurde, wurden nur potentiell funktionale Rezeptormoleküle in der Zellmembran detektiert. Weitere Moleküle, die zwar schon exprimiert jedoch noch im Zytosol vorlagen, wurden in der Messung nicht erfasst. Hier besteht Bedarf weiterer Untersuchungen.

Trotz der Einschränkung durch die Versuchsdurchführung, fügen sich die erhaltenen Ergebnisse gut in die anderer Forschergruppen ein. Rogers et al. konnten ebenfalls ausschließen, dass eine erhöhte extrazelluläre Calcium-Konzentration die CaSR-Expression beeinflusst. In ihren Untersuchungen nahmen Ratten durch ihre Nahrung festgelegte Mengen an Calcium auf bzw. bekamen Calciumionen injiziert. Trotz unterschiedlicher Calcium-Konzentrationen konnten keine Veränderungen in der CaSR-Expression in den Rattennieren festgestellt werden (Rogers et al., 1995). Dies konnte durch Brown et al. bestätigt werden (Brown et al., 1996). Calcium scheint also nicht an der Expressionsregulation beteiligt, sondern nur für die Aktivierung des Rezeptors verantwortlich zu sein.

Neben extrazellulärem Calcium werden weitere Moleküle als mögliche Regulatoren der CaSR-Expression diskutiert. So wird von einigen Arbeitsgruppen Calcitriol, die aktive Form von Vitamin D₃, die Funktion eines positiven Regulators zugeschrieben. Durch die Arbeit von Canaff und Hendy konnten zwei VDREs (*Vitamin D Response Elements*) in der Promotorregion des CaSR-Gens identifiziert werden (Canaff und Hendy, 2002). Andere Untersuchungen sprechen jedoch dagegen, dass die positive Regulation des CaSR durch Calcitriol auch im Falle des NZK zutreffen könnte. Diese besagen, dass Vitamin D₃ in vielen verschiedenen Tumoren, so auch im NZK, reduziert vorliegt (Ikuyama et al., 2002; Blomberg et al., 2010). Falls es auch in den metastasierenden NZK-Tumoren, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, reduziert vorliegt, könnte es nicht als möglicher positiver Regulator des CaSR in Frage kommen. Eine Studie über die Menge von Calcitriol in NZK-Gewebeproben und eine Korrelation mit der CaSR-Expression in den jeweiligen Patienten würde diese Frage klären und steht noch aus.

Für das metastasierte NZK kann auch der Fall zutreffen, dass Calcitriol trotz reduziertem Vorhandensein fähig ist, die Expression des CaSR zu verstärken. Grund für diese Annahme geben Madje et al. Sie zeigten, dass eine reduzierte Bindung von Calcitriol an die Promotorregionen seiner Zielgene in einer Expression dieser Proteine in normalen Mengen führen kann (Madje et al., 2003). Falls Calcitriol in Tumoren reduziert ist, könnte es hier somit trotzdem die Expression des CaSR und weiterer Zielgene positiv regulieren. Die Wirkung von Calcitriol auf den CaSR im NZK ist dennoch umstritten. Durch die Arbeit von Rogers et al. wurde wiederum dargestellt, dass durch Calcitriol keine Hochregulation des CaSR in der Niere hervorgerufen wird (Rogers et al., 1995). Es muss jedoch berücksichtigt

werden, dass die Arbeit an Nieren von Ratten und nicht an humanem Material durchgeführt wurde.

Die Regulation des CaSR könnte nicht nur während der Transkription erfolgen, es könnten zudem Veränderungen des CaSR-Gens bestehen, die die Expression und Funktion des Rezeptors beeinflussen. So würde zum Beispiel ein Gendefekt in einer veränderten CaSR-Expression resultieren. Es sind bereits einige Mutationen im CaSR-Gen beschrieben. Diese Mutationen stehen häufig in Zusammenhang mit Hyperparathyreoidismus und Hypercalcämie (Lam et al., 2005; Reh et al., 2011; Rodrigues et al., 2011).

Der Nachweis des CaSR in Zellen von Patienten mit Knochenmetastasen bestätigt nicht nur die schon zuvor entdeckte Korrelation in NZK-Gewebe, er schafft zudem die Voraussetzung für die nachfolgenden Versuche. In diesen sollte die Rolle von extrazellulärem Calcium in den einzelnen Schritten im Prozess der Knochenmetastasierung untersucht werden. Hierzu wurden funktionelle Tests der NZK-Zellen unter dem Einfluss von Calcium durchgeführt. Da Calcium über den CaSR auf die Zelle wirkt, benötigt sie den Rezeptor um Calcium zu detektieren, ein intrazelluläres Signal und schließlich eine zelluläre Antwort auszulösen.

4.2.3 Calcium fördert die Migration und Proliferation von in Knochen metastasierenden NZK-Zellen via CaSR

Nachdem im vorangegangenen Abschnitt die CaSR-Expression in primären NZK-Zellen dargestellt wurde, sollte nun geklärt werden, ob extrazelluläres Calcium über diesen Rezeptor das zelluläre Verhalten verändert. Es wurden Mechanismen untersucht, die kritische Schritte im Prozess der Metastasierung darstellen: Migration in Richtung des Knochenmilieus und Proliferation im Knochenmilieu zur Vermehrung der Tumorzellen (Oppenheimer, 2006; Chambers et al., 2002; Bashyam, 2002). Zusammen bestimmen sie das metastatische Potenzial von Tumorzellen.

Nach erfolgreicher Ausbreitung durch den Blutkreislauf, Arrest in Kapillaren der Knochen und Adhäsion der Tumorzellen an Komponenten der Knochenmatrix (Fibronektin und Kollagen I) müssen die Zellen migratorisch in das Gewebe eindringen, um dort überleben und proliferieren zu können. Da Knochen der Hauptspeicher für Calcium sind, verläuft die Migration in Richtung einer erhöhten extrazellulären Calcium-Konzentration. Im durchgeführten Migrationsversuch wurden die NZK-Zellen von Patienten mit Knochenmetastasen deutlich stärker chemotaktisch von Calcium angelockt als nichtmetastasierende NZK-Zellen (Tabelle 4.2). Nicht-metastasierende NZK-Zellen bzw. die von Patienten mit Lungenmetastasen besaßen nur eine geringe Fähigkeit in Richtung der erhöhten Calcium-Konzentration zu migrieren. Je mehr CaSR von den Zellen exprimiert wird, desto stärker migrieren sie in Richtung der erhöhten extrazellulären Calcium-Konzentration. Diese Fähigkeit besitzen ausschließlich NZK-Zellen, die im Patienten Knochenmetastasen ausbilden. Das Ergebnis deutet auf eine vom CaSR abhängige Metastasierung der NZK-Zellen in Knochen hin.

Tabelle 4.2:

Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellmigration und -proliferation der NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungsstatus.

Die Tabelle zeigt die Migrationsfähigkeit der primären NZK-Zellen unter Verwendung von Calcium als Chemotaxin und die Proliferationsfähigkeit nach Behandlung mit Calcium in unterschiedlichen Konzentrationen (2,5 mM, 5 mM, 10 mM). Zeichenerklärung: + = schwache Migration/Proliferation, + + = mittlere Migration/Proliferation, + + + = starke Migration/Proliferation, + + + = sehr starke Migration/Proliferation.

Zellmigration	10 mM Calcium	Zellproliferation	unbehandelt	2,5 mM Calcium	5 mM Calcium	10 mM Calcium
keine Metastasen	+	keine Metastasen	+	+	+	+
Lungenmetastasen	++	Lungenmetastasen	+	+	+	+
Knochenmetastasen	++++	Knochenmetastasen	+	+	+++	++++

Die aufgestellten Folgerungen bestätigen die Aussagen, die zuvor von anderen Arbeitsgruppen für Mammakarzinomzellen und Tumorzellen aus dem Schilddrüsenkarzinom getroffen wurden. Saidak et al. konnten zeigen, dass Calcium die chemotaktische Migration von Mammakarzinomzellen von Patienten mit Knochenmetastasen fördert. Durch Ausschalten des CaSR mittels siRNA wurde zudem nachgewiesen, dass die Wirkung von Calcium auf die Migration über den CaSR zustande kam (Saidak et al., 2009b). In Tumorzellen aus dem Schilddrüsenkarzinom von Ratten konnte durch Verwendung eines CaSR-Aktivators die Zellmigration gesteigert werden (Tharmalingam et al., 2011). Es bestehen daher viele Hinweise darauf, dass Calcium mit seiner Wirkung über den CaSR die Zellmigration begünstigt und somit entscheidend zur Bildung von Knochenmetastasen verschiedener Tumorentitäten beiträgt.

Sind die Tumorzellen in der Knochenmatrix angekommen, vermehren sie sich durch Proliferation und bilden schließlich einen neuen Tumorzellverband. Dieser letzte Schritt im Prozess der Metastasierung in Knochen verläuft ebenfalls unter dem Einfluss eines erhöhten extrazellulären Calcium-Spiegels. In der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass Calcium nicht nur einen pro-migratorischen Effekt auf in Knochen metastasierende NZK-Zellen hat, sondern auch einen pro-proliferativen Effekt. Calcium induzierte eine konzentrationsabhängige Steigerung der Proliferationsrate der NZK-Zellen von Patienten mit Knochenmetastasen (Tabelle 4.2). Dagegen zeigte das proliferative Verhalten von nichtmetastasierenden NZK-Zellen und NZK-Zellen von Patienten mit Lungenmetastasen keine Reaktion auf verändertes extrazelluläres Calcium. Somit korrelierte nicht nur die Migrationssondern auch die Proliferationsfähigkeit mit der Expressionsstärke des CaSR und mit dem Metastasierungsort der NZK-Zellen.

Auch in Mesangiumzellen, Ovarialzellen und Astrozyten wird durch eine Aktivierung des CaSR die Proliferation induziert (Kwak et al., 2005; Chattopadhyay et al., 1999; Hobson et al., 2000). Diese positive Regulation der Proliferation durch den CaSR wurde zudem für maligne Zellen aus dem Hodentumor und dem Mammakarzinom beschrieben (Tfelt et al., 2004; Hiani et al., 2009). Liao et al. postulierten in ihrer Arbeit an Prostatakarzinomzellen die auch hier beschriebene Hypothese, dass Calcium durch seine pro-proliferative Wirkung über den CaSR die Bildung von Metastasen in Knochen unterstützt (Liao et al., 2006). Es gibt jedoch auch Forschungsergebnisse, die diesen Arbeiten widersprechen. So stoppt Calcium in Kolonkarzinomzellen die Zellvermehrung durch Reduktion der Proliferation (Bhagavathula et al., 2005). Liu et al. stellten bei ihren Untersuchungen an Kolonkarzinomzellen fest, dass die tumorsuppressive Wirkung von Vitamin D über die Aktivierung des CaSR und der damit einhergehenden Inhibition von Proliferation und Invasion zustande kommt (Liu et al., 2010).

Auf Grund der Kontroversen in der Literatur ist davon auszugehen, dass die unterschiedlichen Effekte von Calcium über den CaSR gewebespezifisch sind. Der CaSR ist in der Lage Tumorprogression und Metastasierung zu fördern, aber auch zu stoppen (Chakravarti et a., 2009). Er kann daher als Onkogen, aber auch als Tumorsuppressor wirken. Welche Wirkweise der CaSR entfaltet scheint abhängig vom Zelltyp bzw. der Tumorentität zu sein und muss im Gesamtkontext betrachtet werden.

Zur Überprüfung der Funktion von Calcium und dem CaSR bei der organspezifischen NZK-Metastasierung in Knochen wurde ein allosterischer Antagonist des CaSR herangezogen. Dadurch sollte gezeigt werden, ob die Wirkung von Calcium tatsächlich über den CaSR zustande kommt oder ob Alternativen in Betracht gezogen werden müssen. Der CaSR- Inhibitor NPS 2143 blockiert den CaSR und verhindert die Bindung von extrazellulärem Calcium und eine damit verbundene Signalweiterleitung in die Zelle (Nemeth, 2002; Saidak et al., 2009c). Die nachgeschaltete Bildung von Inositoltrisphosphat wird inhibiert, was letztendlich in einem reduzierten Einstrom von intrazellulärem Calcium aus dem Endoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma resultiert. In Konzentrationen von 3 µM hat NPS 2143 keinen Effekt auf andere G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, obwohl sie dem CaSR strukturell teilweise stark ähneln. Dies spricht für die Selektivität des Inhibitors (Nemeth et al., 2001; Arey et al., 2005).

In den hier durchgeführten Tests wurde eine Hemmung des durch Calcium ausgelösten zellulären Verhaltens mittels Inhibitor beobachtet. Die Fähigkeit der in Knochen metastasierenden NZK-Zellen in Richtung der höheren Calcium-Konzentration zu migrieren, wurde durch den CaSR-Inhibitor aufgehoben. Die durch Calcium ausgelöste Steigerung der Proliferation konnte ebenfalls durch Inhibitor-Behandlung aufgehoben werden. Sie blieb sogar bestehen, wenn nach 30minütiger Inhibitor-Behandlung die Zellen weitere 30 Minuten mit Inhibitor und Calcium in Kombination kultiviert wurden. Alle CaSR-Moleküle der Zellen schienen somit effizient blockiert und nicht mehr zugänglich für Calcium zu sein. Das Verhalten nicht-metastasierender NZK-Zellen wurde durch den Inhibitor kaum beeinflusst. Durch Blockierung des CaSR konnte somit den zellulären Veränderungen, die zuvor durch Calcium hervorgerufen wurden, entgegengewirkt werden. Mit diesen Ergebnissen wurde belegt, dass Calcium über den CaSR auf die metastasierenden NZK-Zellen einwirkt und scheinbar ihr Potenzial, in Knochen zu metastasieren, weiter steigert. Alternative Rezeptoren können höchstens für eine zusätzliche, aber weniger ausschlaggebende Bindung von Calcium und dessen Signalweiterleitung in die Zellen in Betracht gezogen, dürfen aber nicht ausgeschlossen werden.

Die Untersuchungen dieser Arbeit verdeutlichen, dass das Metastasierungspotenzial verstärkt wird, sobald die in Knochen-metastasierenden NZK-Zellen das mit Calcium angereicherte Knochenmilieu erreichen. Calcium fördert die Migration in die Knochenmatrix und die Proliferation zur Ausbildung einer Knochenmetastase. Die zellulären Antworten, die Calcium auslöst, kommen über den CaSR zustande. Aus diesem Grund verändert Calcium ausschließlich das Metastasierungspotenzial der NZK-Zellen, die den CaSR in ausreichender Menge exprimieren. Die hohe CaSR-Expression stellt einen entscheidenden Selektionsvorteil gegenüber anderen NZK-Zellen dar.

4.2.4 Über Aktivierung der dem CaSR nachgeschalteten Signalwege begünstigt Calcium die NZK-Knochenmetastasierung

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit lag in der Aufklärung der molekularen Hintergründe, die zu dem durch Calcium ausgelösten Migrations- und Proliferationsverhalten der NZK-Zellen führen. Hierzu wurden insbesondere Signalmediatoren untersucht, über die bekannt ist, dass sie dem CaSR nachgeschaltet und an der Regulation von Migration und Proliferation beteiligt sind. Die Analysen wurden nach einer Behandlung der Zellen mit Calcium durchgeführt.

Der CaSR ist dafür verantwortlich, Veränderungen des extrazellulären Calcium-Levels in ein entsprechend mehr oder weniger stark ausgeprägtes intrazelluläres Signal umzuwandeln. Diese Signalweiterleitung verläuft über verschiedene Wege und kann schließlich Prozesse der Tumorprogression und Metastasierung, wie Migration, Adhäsion, Proliferation und Apoptose regulieren. In den untersuchten NZK-Zellen wurden verschiedene Moleküle in ihrer Expression bzw. Aktivität verändert, sobald die Zellen in ein Calcium-reiches Milieu gelangen: die Kinase Akt, der Tumorsuppressor PTEN, die MAP-Kinasen p38 α und JNK, der Transkriptionsfaktor c-Jun, das Adapterprotein Paxillin und die Phospholipase C γ 1.

4.2.4.1 Calcium aktiviert den Akt-Signalweg

Die Aktivität von Akt wird in NZK-Zellen mit Fähigkeit zur Knochenmetastasierung durch Calcium verstärkt (Tabellen 4.3 und 4.4). Dieser Effekt konnte für zwei unterschiedliche Phosphorylierungsstellen gezeigt werden: Serin 473 und Threonin 308. Die Phosphorylierung von Akt an Threonin 308 erfolgt nach Rekrutierung an Phospholipide an der Zellmembran durch PDK1 (Phosphoinositide-dependent Kinase-1). PDK1 wird durch die PI3-Kinase aktiviert, die wiederum dem CaSR nachgeschaltet ist (Hers et al., 2011; Li et al., 2012). Serin wird durch den mTOR-Komplex 2 (mTORC2) phosphoryliert, wobei eine 473 Autophosphorylierung ebenfalls in Betracht gezogen wird (Sarbassov et al., 2005; Toker und Newton, 2000). Die verstärkte Phosphorylierung an Threonin 308 lässt sich daher mit der erhöhten Expression des CaSR erklären; die verstärkte Phosphorylierung an Serin 473 ist auf die in NZK häufig verstärkte Aktivität von mTOR zurückzuführen (Kruck et al., 2010; Pantuck et al., 2007). Calcium sorgt durch Aktivierung des Akt-Signalwegs für eine erhöhte Metastasierungsfähigkeit der NZK-Zellen, die den CaSR überexprimieren und dazu prädestiniert sind in Knochen zu metastasieren (Abbildung 4.1). Somit bestätigen diese Ergebnisse die CaSR-Signalweiterleitung, die bereits in anderen Zelltypen beobachtet wurde (Liao et al., 2006; Tfelt-Hansen et al., 2004; Li et al., 2012).

Bezüglich der unterschiedlichen Akt-Phosphorylierungsstellen muss erwähnt werden, dass in der Literatur viele Kontroversen bestehen. So konnte noch nicht eindeutig geklärt werden, ob die beiden Stellen unabhängig voneinander phosphoryliert werden oder ob sie sich gegenseitig in ihrer Phosphorylierbarkeit beeinflussen. Zudem ist es fraglich, welche Stellen phosphoryliert sein müssen, damit Akt vollständig aktiv ist und ob die einzelnen Phosphorylierungsstellen nicht eher zur Spezifität als zur Aktivität von Akt beitragen (Hers et al., 2011).

Tabelle 4.3:

Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressions-Analysen von primären NZK-Zellen.

Die Tabelle zeigt den Aktivierungsstatus bzw. die Expression verschiedener Signalmediatoren in NZK-Zellen. Die Zellen wurden unbehandelt und nach Calcium-Behandlung untersucht und stammten von Patienten mit unterschiedlichem Metastasierungsstatus. Zeichenerklärung: $0 = \text{keine Expression/Aktivität}, + = \text{schwache Expression/Aktivität}, + + = mittlere Expression/Aktivität}, + + + = sehr starke Expression/Aktivität.$

Expressionen		Integrin α5	pFAK	pAkt (S473)	pAkt (T308)	pShc	pErk	PTEN	Nedd 4.1
keine Metastasen	unbehandelt	+	+	+	++	+++	+++	+++	++
	Calcium	+	+	+	++	+	+	0	+
Lungenmetastasen	unbehandelt	++	+	++	+++	+	+	+	+
	Calcium	++	++	++	+++	+	+	0	+
Knochenmetastasen	unbehandelt	++++	+++	+++	++	+	+	+	+++
	Calcium	++++	++++	++++	+++	+	+	0	++

Tabelle 4.4:

Zusammenfassung der Ergebnisse des Phospho-Kinase-Arrays mit primären NZK-Zellen.

Die Tabelle zeigt den Aktivierungsstatus verschiedener Signalmediatoren in NZK-Zellen. Die Zellen wurden unbehandelt und nach Calcium-Behandlung untersucht und stammten von Patienten mit unterschiedlichem Metastasierungsstatus. Zeichenerklärung: 0 = keine Expression/Aktivität, + = schwache Expression/Aktivität, + = mittlere Expression/Aktivität, + + = starke Expression/Aktivität, + + + = sehr starke Expression/Aktivität.

Expressionen		pErk	pAkt (S473)	pAkt (T308)	p p38α	pJNK	p c-Jun	p Paxillin	р PLCү
keine Metastasen	unbehandelt	+++	+	++	++	++	++	++	++
	Calcium	+	+	++	+	+	++	++	++
Knochenmetastasen	unbehandelt	+	+++	++	++	++	++	+	++
	Calcium	+	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++

Im Gegensatz zum Akt-Signalweg wurde die MAP-Kinase Erk in metastasierenden NZK-Zellen nicht von Calcium beeinflusst (Tabellen 4.3 und 4.4). Die CaSR-Signalweiterleitung verläuft in den hier untersuchten NZK-Zellen somit nicht über Erk, sondern über die PI3-Kinase und Akt. Ein ausbleibender Effekt von Calcium auf den Erk-Signalweg wurde auch 124 von der Arbeitsgruppe um Tfelt-Hansen nachgewiesen (Tfelt-Hansen et al., 2004). Andere Arbeitsgruppen konnten die Wirkung von Calcium auf die Zelle jedoch durch eine Aktivierung des Erk-Signalwegs parallel zum Akt-Signalweg erklären (Liao et al., 2006; Saidak et al., 2009b; Xing et al., 2011). Da die Untersuchungen an unterschiedlichen Zellen durchgeführt wurden, scheint die Funktion und Signalweiterleitung des CaSR Zelltypspezifisch zu sein (Huang und Miller, 2007).



Abbildung 4.1:

Schematische Darstellung der von Calcium aktivierten Signalweiterleitung via CaSR, die eine knochenspezifische NZK-Metastasierung begünstigt.

Eine erhöhte extrazelluläre Calcium-Konzentration führt zu einer verstärkten Aktivierung des CaSR und der ihm nachgeschalteten Signalwege. Über den Akt/PKB-, die MAPK-Signalwege (JNK und p38 α) und PLC γ -1 werden Migrations- und Proliferationsfähigkeit der in Knochen metastasierenden NZK-Zellen erhöht.

4.2.4.2 Calcium aktiviert die MAPK-Signalkaskade

Der p38α MAPK-Signalweg bietet dem CaSR eine weitere Möglichkeit um nach Calciumbindung ein Signal in die Zelle zu leiten. Der p38α MAPK sind diverse andere Kinasen und Transkriptionsfaktoren nachgeschaltet. Über sie nimmt p38α vor allem Einfluss auf die Regulation von Proliferation, Apoptose, Differenzierung und Tumorprogression (Zarubin und Han, 2005; Wagner und Nebreda, 2009). Die Wirkweise hierbei kann zelltypspezifisch sein (Bradham und McClay, 2006). In Zervixkarzinomzellen (HeLa-Zellen) induziert p38 beispielsweise Apoptose; p38-defiziente Fibroblasten bildeten in Mäusen Tumore aus (Deacon et al., 2003; Brancho et al., 2003). Andere Arbeitsgruppen beobachteten in Fibroblasten und Hodentumorzellen einen gegenläufigen Effekt. In diesen Zellen inhibiert Calcium über den CaSR und Aktivierung der p38α MAP-Kinase Apoptose (Tfelt-Hansen et al., 2003; Tfelt-Hansen et al., 2004; Ogata et al., 2006). In Lungenkarzinomzellen kommt der p38-MAPK-Signalkaskade eine Funktion als positiver Regulator von Invasion und Migration zu (Liang et al., 2012). Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation fügen sich gut in letztere Aussagen. Eine Calcium-Behandlung führte in den NZK-Zelllinien mit Fähigkeit zur Knochenmetastasierung zu einem deutlichen Anstieg der p38α-Aktivität mit einhergehender Induktion von Proliferation und Migration (Tabelle 4.4) (Abbildung 4.1).

Ebenso wie Erk und p38 α ist auch JNK eine Komponente der dem CaSR-nachgeschalteten MAPK-Signalkaskaden. Das Aktivitätsmuster von JNK ähnelt dem der p38 α MAPK. Eine erhöhte extrazelluläre Konzentration an Calcium löste in den in Knochen metastasierenden NZK-Zellen eine Aktivitätssteigerung von JNK aus (Tabelle 4.4) (Abbildung 4.1). Dieser Effekt wurde bereits in den Arbeiten von Tfelt-Hansen und Ogata an Hodentumorzellen und Fibroblasten beobachtet (Tfelt-Hansen et al., 2003; Ogata et al., 2006). Die Signalweiterleitung von JNK verläuft nach dem gleichen Schema wie die der p38 α MAPK. Es werden verschiedene Kinasen und Transkriptionsfaktoren aktiviert, die Apoptose inhibieren und Tumorprogression und Metastasierung unterstützen (Zarubin und Han, 2005).

Zu den JNK nachgeschalteten Transkriptionsfaktoren zählt unter anderem das Protoonkogen c-Jun (Krauss, 2003). Das Aktivitätsmuster von c-Jun in NZK-Zellen mit Potenzial zur Knochenmetastasierung stimmt mit dem seines Aktivators JNK überein (Tabelle 4.4). Nach Calcium-Behandlung konnte eine erhöhte Aktivität von c-Jun gemessen werden. Die Wirkung von Calcium über die JN-Kinase auf die Zelle kommt also über c-Jun zustande (Abbildung 4.1). In der Literatur finden sich derzeit zwar einige Hinweise, die für die Calcium-Signalweiterleitung über den CaSR und JNK sprechen, die Aktivität von c-Jun wurde in diesem Zusammenhang jedoch noch nicht untersucht. Es spricht vieles für eine solche Signalweiterleitung, da c-Jun eines der Hauptzielproteine von JNK ist und der Signalweg häufig mit Kanzerogenese und Metastasierung einhergeht. So korreliert eine erhöhte Aktivität des JNK-Signalwegs mit der Tumorentstehung und Lymphknotenmetastasierung bei

Schilddrüsenkrebs (Wang et al., 2010). Durch Überexpression von c-Jun in Mammakarzinomzellen konnte deren Wachstum und die Migrationsfähigkeit gesteigert werden. Im Mausmodell wurde dadurch die Metastasierung in die Leber erleichtert (Zhang et al., 2007)

Darüber hinaus ist in der Literatur beschrieben, dass JNK über Aktvierung von Paxillin die Zellmotilität fördert. Paxillin ist ein Adaptermolekül, das an Fokalkontakten lokalisiert ist und hier mit verschiedenen Signalmolekülen interagiert. Nach Phosphorylierung durch JNK rekrutiert Paxillin weitere Moleküle an die Fokalkontakte. Dadurch wird die Signalweiterleitung der Integrine unterstützt und die Migration und Adhäsion von Zellen gefördert (Turner, 1998). Diese Förderung wurde unter anderem in Leberkarzinomzellen aufgedeckt (Ching et al., 2007). In der Arbeit von Huang et al. kam es in Epithelzellen der Kornea ebenfalls zu einer Regulation der Zellmigration über den JNK-Paxillin-Signalweg (Huang et al., 2008). Vergleichbares wurde in Keratinozyten von Fischen und Blasenepithelzellen von Ratten beobachtet (Huang et al., 2003). Der Signalweg ist in den unterschiedlichsten Zelltypen an der positiven Regulation der Migration beteiligt. Dies bekräftigt die migrationsfördernde Wirkung von JNK über Paxillin in den hier untersuchten NZK-Zellen. Ein erhöhter extrazellulärer Calcium-Spiegel führte zu einer verstärkten Phosphorylierung und damit Aktivierung von JNK und Paxillin in NZK-Zellen von Patienten mit Knochenmetastasen (Tabelle 4.4). In diesen Zellen wirkt Calcium nicht nur über den JNK-c-Jun-Signalweg, sondern zusätzlich über den JNK-Paxillin-Signalweg auf Prozesse der Metastasierung (Abbildung 4.1).

4.2.4.3 Calcium aktiviert den PLCy-1-Signalweg

In den hier durchgeführten Untersuchungen der NZK-Zellen, die in Knochen metastasieren, hatte eine erhöhte extrazelluläre Calcium-Konzentration zudem einen Anstieg in der Aktivität der Phospholipase C γ -1 zur Folge (Tabelle 4.4). In nicht-metastasierenden NZK-Zellen blieb die Aktivität von PLC γ -1 unberührt. PLC γ -1 kommt die Aufgabe zu, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in die beiden *second messengers* Inositoltrisphosphat und Diacylglycerol zu spalten. Dies führt zur Aktivierung der Proteinkinase C und Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern. Hierdurch werden unter anderem Proliferation gefördert und Apoptose gehemmt (Krauss, 2003). In der Literatur ist PLC γ -1 als ein dem CaSR nachgeschaltetes Signalmolekül beschrieben (Huang und Miller, 2007). In Osteoblasten konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Zugabe von Calcium und

Aktivitätszunahme von PLC γ -1 identifiziert werden (Godwin und Soltoff, 2002). Durch Tharmalingam et al. wurde die Signalweiterleitung in Tumorzellen aus dem Schilddrüsenkarzinom von Ratten aufgedeckt (Tharmalingam et al., 2011). Ähnliche Mechanismen erklären die PLC γ -1-Aktivierung nach Calcium-Behandlung in Tumorzellen aus dem in Knochen metastasierenden NZK. Erreichen NZK-Zellen auf ihrem Weg durch das Kreislaufsystem die Calcium-reiche Knochenmatrix wird somit eine Signalweiterleitung des CaSR über PLC γ -1 hervorgerufen und die Proliferation verstärkt (Abbildung 4.1).

Wie bereits erwähnt, wird der Akt-Signalweg nicht nur durch Integrine und den CaSR, sondern zudem durch RTK aktiviert (Hers et al., 2011). Gelangen NZK-Zellen auf ihrem Weg durch das Blutkreislaufsystem in die Knochenmatrix kann es hier nicht nur durch Calcium zur verstärkten Akt-Aktivierung kommen. Auf Grund des ständig stattfindenden Knochenumbaus werden vermehrt Wachstumsfaktoren freigesetzt, die über die RTK parallel zum CaSR die Akt-Aktivierung fördern können. Es muss also davon ausgegangen werden, dass die Aktivierung des Signalwegs in der Knochenmatrix zusätzlich verstärkt wird. Je weiter die osteolytische Metastasenbildung vorangeschritten ist, desto stärker steigt der Level an Calcium und Wachstumsfaktoren in der Knochenmatrix an. Dies begünstigt das Wachstum der vorhandenen Tumorzellen und erleichtert nachkommenden NZK-Zellen die Adhäsion und Migration in die Knochen. Somit könnte auch in Knochenmetastasen des NZK ein sogenannter "Teufelskreis" entstehen, wie er bereits für Knochenmetastasen des Mammakarzinoms beschrieben wurde (Saidak et al., 2009a).

4.2.4.4 Calcium reduziert die PTEN-Expression

Ein erhöhter extrazellulärer Calcium-Spiegel hatte zur Folge, dass der Tumorsuppressor PTEN in den NZK-Zellen fast nicht mehr detektierbar war (Tabelle 4.3). Somit fehlt ein wichtiger Gegenspieler der Akt- und MAPK-Signalwege, die dadurch weiter verstärkt aktiviert werden und Prozesse der Knochen-spezifischen NZK-Metastasierung induzieren (Abbildung 4.1). Die Ubiquitinligase Nedd4.1 ist für den proteasomalen Abbau von PTEN verantwortlich. Die ausbleibende gesteigerte Expression von Nedd4.1 nach Calcium-Behandlung (Tabelle 4.3) zeigt jedoch, dass die PTEN-Reduktion in diesen Analysen nicht durch den von Nedd4.1 eingeleiteten Abbau bewältigt wird.

Die durch Calcium verursachten Veränderungen in der PTEN-Expression müssen nicht ausschließlich durch den CaSR bedingt sein. Es ist möglich, dass für die Signalweiterleitung alternative Wege benutzt werden. Hierfür würde zudem sprechen, dass Calcium auch in nichtmetastasierenden NZK-Zellen, die den CaSR nur in sehr geringen Mengen exprimieren, PTEN fast vollständig reduziert. Ein hypothetischer Mechanismus für diese alternative Calcium-Signalweiterleitung wird im Folgenden erläutert.





Konzentration verstärkt via S100A4 die Aktivierung von RAGE, was wiederum eine Reduktion des PTEN-Transkriptionsaktivators p53 zur Folge hat.

Es wurden bisher noch keine direkten Zusammenhänge zwischen p53, dem positiven Genregulator von PTEN, und einem Einfluss von Calcium über den CaSR beschrieben. Es besteht jedoch eine mögliche Verbindung über das S100A4-Protein (Abbildung 4.2). Wenn S100A4 nach erfolgter Sekretion durch Tumorzellen extrazellulär vorliegt, kann es dort durch Calciumbindung dimerisieren und mit anderen Proteinen interagieren. Das membranständige RAGE (Receptor for advanced glycation end products) kommt als Bindungspartner für S100A4 in Frage und kann das durch Calcium ausgelöste Signal in die Zelle weiterleiten (Donato, 2007). RAGE ist als Tumorantigen des NZK bekannt, wird also von NZK-Zellen exprimiert (Neumann et al., 1998). Der von RAGE ausgehende Signalweg führt zu einer negativen Regulation von p53, was mit einer fehlenden Induktion der PTEN-Expression einhergeht (Brune et al., 2012). Ein Zusammenhang zwischen dem Calcium-bindenden \$100A4-Protein und p53 wurde von Sherbet und Lakshmi beobachtet (Sherbet und Lakshmi, 1998). S100A4 kommt generell eine wichtige Rolle bei der Regulation von Prozessen zu, die Tumorzellen darin fördern zu metastasieren, was ihm zu dem zweiten Namen Metastasin verholfen hat (Helfman et al., 2005; Boye und Maelandsmo, 2010). Der vorgestellte Regulationsmechanismus ist unabhängig vom CaSR, da Calcium über einen alternativen Signalweg auf die Zelle einwirkt. Diese Hypothese würde daher auch auf nichtmetastasierende NZK-Zellen zutreffen, die eine reduzierte Expression des CaSR aufweisen.

In der aktuellen Forschung wird außerdem eine posttranskriptionale Regulation von PTEN durch die microRNA miRNA-21 diskutiert (Meng et al., 2007). Im Lungenkarzinom konnte eine Überexpression der miRNA-21 festgestellt werden, die invers mit der PTEN-Expression korrelierte. Hierbei wurde auch verbessertes Wachstum und Invasion beobachtet (Zhang et al., 2010). Folgende weitere miRNAs werden mit einer negativen PTEN-Regulation in Verbindung gebracht: miRNA-214, miRNA-29b, miRNA-221 und 222. In Tumorzellen kommt es häufig zu einer Überexpression dieser miRNAs, die zu einer Förderung von Tumorwachstum und Metastasierung führt, weil die tumorsuppressive Wirkung von PTEN ausbleibt (Fata et al., 2012). Ein Zusammenhang zwischen dem Einfluss von extrazellulärem Calcium auf Tumorzellen und Veränderungen der miRNAs wurde bisher jedoch noch nicht beschrieben, wäre aber eine zu testende Option für die Calcium-abhängige Regulation von PTEN.

Mit Hilfe des allosterischen CaSR-Inhibitors NPS 2143 konnte ein Teil der zuvor beschriebenen CaSR-Signalweiterleitung in metastasierenden NZK-Zellen bestätigt werden. Durch Einsatz des Inhibitors wurde der Aktivitätssteigerung von Akt entgegengewirkt. Diese Hemmung wurde bei zusätzlicher Zugabe von Calcium beibehalten, was zeigt, dass Calcium über den CaSR wirkt und keine Alternativwege impliziert (Tabelle 4.5). Da der CaSR nicht mehr in der Lage ist Calcium zu detektieren und das Signal an Akt weiterzuleiten, bleibt die verstärkte Akt-Phosphorylierung aus (an beiden untersuchten Phosphorylierungsstellen). Die Reduktion von PTEN, die durch Calcium ausgelöst wurde, konnte mittels Inhibitor-Behandlung in den in Knochen metastasierenden NZK-Zellen vollständig aufgehoben werden (Tabelle 4.5). Im Gegensatz zu diesen Zellen hatte der Inhibitor nur einen geringen Einfluss auf die Signalmoleküle in nicht-metastasierenden NZK-Zellen. Dies ist bedingt durch das nachgewiesene reduzierte Vorhandensein von CaSR in den Zellen und die damit verbundenen ausbleibenden zellulären Effekte durch Calcium bzw. den Antagonisten. Wurde der Rezeptor zunächst blockiert und anschließend zusätzlich Calcium zu den nicht-metastasierenden Zellen gegeben, konnte die PTEN-Reduktion wieder erreicht werden, was in metastasierenden Zellen nicht der Fall war (Tabelle 4.5). Die Beobachtung spricht wiederum dafür, dass die Wirkung von extrazellulärem Calcium besonders auf nicht-metastasierende Zellen über einen alternativen Signalweg zustande kommen muss, der in Knochen-metastasierenden Zellen nicht aktiviert wird. Dieser Signalweg kann trotz CaSR-Blockierung reguliert werden und muss somit CaSR-unabhängig sein.

Tabelle 4.5:

Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressionsanalyen primärer NZK-Zellen mit und ohne Inhibitor (NPS 2143)-Behandlung.

Die Tabelle zeigt die Expression bzw. den Aktivierungsstatus verschiedener Signalmediatoren in NZK-Zellen. Die Zellen wurden unbehandelt und nach Calcium-Behandlung untersucht und stammten von Patienten mit unterschiedlichem Metastasierungsstatus. Zeichenerklärung: 0 = keine Expression/Aktivität, + = schwache Expression/Aktivität, + + = mittlere Expression/Aktivität, + + = starke Expression/Aktivität, + + + = sehr starke Expression/Aktivität.

Expressio	pAkt (S473)	pAkt (T308)	pErk	PTEN	
keine Metastasen	unbehandelt	++	++	++	++
	Calcium	++	++	+	0
	NPS 2143	++	++	+++	++
	NPS + Calcium	++	++	+++	+
Knochenmetastasen	unbehandelt	+++	++	++	+
	Calcium	++++	+++	++	0
	NPS 2143	++	+	0	+
	NPS + Calcium	++	+	0	+

4.2.5 Alternative, CaSR-unabhängige Wege bei der Calcium-Signalweiterleitung in NZK-Zellen

In NZK-Zellen von Patienten, die keine Metastasen entwickelten lag eine deutlich geringere CaSR-Expression vor, als in Zellen, die in Knochen metastasieren. Diese Zellen zeigten bezüglich mancher Signalmediatoren trotzdem Reaktionen auf eine veränderte extrazelluläre Calcium-Konzentration. Hinweise auf Calcium-unabhängige Zellaktivitäten geben auch im letzten Kapitel diskutierte Beobachtungen. Durch eine Behandlung mit Calcium wurde eine Reduktion in der PTEN-Expression und in der Aktivität von Shc und der MAP-Kinasen Erk, p38α und JNK gemessen. Es lassen sich verschiedene Hypothesen aufstellen, um diese Effekte zu erklären. Eine besteht darin, dass die Menge an vorhandenem CaSR in nichtmetastasierenden Zellen zwar eine Bindung von geringen Mengen an Calcium und eine Signalweiterleitung ermöglichte, diese jedoch nicht stark genug war, um alle nachgeschalteten Moleküle zu erreichen und eine zelluläre Antwort hervorzurufen. Hierfür würde sprechen, dass die der JN-Kinase nachgeschalteten Moleküle c-Jun und Paxillin kaum eine Reduktion in ihrer Aktivität aufwiesen. Auf Grund von fehlenden CaSR-Molekülen könnte extrazelluläres Calcium auf alternative Rezeptoren ausweichen bzw. durch Ionenkanäle in die Zelle gelangen und eine intrazelluläre Wirkung entfalten. In diesem Fall kommen die metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR), γ -Aminobuttersäure (GABA)_B-Rezeptoren, TRP (*transient receptor potential channels*)-Ionenkanäle und die bereits oben beschriebenen Calciumbindenden Proteine der S100-Familie in Frage (Brown und McLeod, 2001; Kubo et al., 1998; Wise et al., 1999; Hsu et al., 2007; Prevarskaya et al., 2007; Helfman et al., 2005). Die Hypothese, die zur Erklärung der PTEN-Reduktion durch Calcium aufgestellt wurde, legt die Vermutung nahe, dass die S100A4-Proteine beteiligt sind.

Metabotrope Glutamatrezeptoren und GABA_B-Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die eine dem CaSR ähnliche Struktur aufweisen. Für die mGlu Rezeptortypen 1, 3 und 5 konnte nachgewiesen werden, dass sie nicht nur durch Glutamat, sondern auch durch Calcium, in Konzentrationen zwischen 0,1-10 mM, aktiviert werden können. GABA_B-Rezeptoren waren sensitiv für Konzentrationen zwischen 0,001-1µM. mGlu- und GABA_B-Rezeptoren sind hauptsächlich im Gehirn vorzufinden, wo sie wesentlich zur Regulation der Reizweiterleitung an Synapsen beitragen (Kubo et al., 1998; Tabata und Kano, 2004; Wise et al., 1999). Über eine mögliche Expression beider Rezeptoren in der Niere ist in der Literatur bisher jedoch nichts beschrieben. Somit würde eine Untersuchung des Vorhandenseins von mGlu- und GABA_B-Rezeptoren auf NZK-Zellen die erste Maßnahme zur Überprüfung einer solchen CaSR-unabhängigen Detektion von extrazellulärem Calcium darstellen.

TRP-Ionenkanäle können im Gegensatz zu den beschriebenen Molekülen kein extrazelluläres Calcium detektieren, sind aber permeabel für Calciumionen. Sie können Calcium in die Zelle leiten und dadurch Reaktion, wie verstärkte Proliferation und Inhibition der Apoptose, auslösen (Krauss, 2003; Santoni et al., 2011). Es ist bekannt, dass verschiedene Klassen der TRP-Kanäle in der Niere entlang der Nephrone exprimiert werden. Hier werden sie für die Reabsorption von Kationen benötigt (Hsu et al., 2007). In verschiedenen Tumorentitäten, wie zum Beispiel dem Melanom und Prostatakarzinom, liegt eine erhöhte TRP-Expression vor (Prevarskaya et al., 2007). In der aktuellen Literatur wird zudem diskutiert, ob TRP-Kanäle als neue Marker für das Mammakarzinom in Frage kommen (Ouadid-Ahidouch et al., 2012). Im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit konnte bereits festgestellt werden, dass bestimmte TRP-Kanäle (TRPM7) in NZK-Gewebeproben von Patienten exprimiert sind (Plattfaut, 2011). In wie weit diese Kanäle eine Rolle in der Knochenmetastasierung spielen, ist jedoch nicht bekannt.

4.3 Bestimmte Charakteristika des NZK-Primärtumors begünstigen unabhängig von Calcium die Knochen-spezifische Metastasierung

Neben der Calcium-abhängigen Knochenmetastasierung des NZK konnten in der vorliegenden Dissertation bestimmte Expressions- und Verhaltensmuster der in Knochen metastasierenden NZK- Zellen aufgedeckt werden, die unabhängig von Calcium waren. Die Spezifität der Tumorzellen wird somit nicht nur vom Mikromilieu des sekundären Organs bestimmt, sondern zudem durch die bereits im Primärtumor vorliegende charakteristische Ausstattung einer Zelle, die unberührt von der hohen Calcium-Konzentration im Knochen bleibt.

4.3.1 Charakteristisches Metastasierungsverhalten: Eine erhöhte Migrations- und Adhäsionsfähigkeit von NZK-Zellen geht mit der Bildung von Knochenmetastasen einher

Der erste Schritt der Metastasierung besteht im Loslösen der Tumorzellen aus dem Primärtumor und der Migration durch die EZM in Richtung Blutgefäße. Die Migration spielt auch zu einem späteren Zeitpunkt der Metastasierung eine große Rolle, nämlich bei der Extravasation der Tumorzellen aus den Kapillaren durch das Endothel in das Gewebe des sekundären Organs. Eine erfolgreiche Ausbreitung von Tumorzellen bis in ein sekundäres Organ ist somit abhängig von ihrer Migrationsfähigkeit.

Um diese an primären NZK-Zellen von Patienten mit unterschiedlichem Metastasierungsstatus zu untersuchen, wurde Fibronektin als Lockstoff verwendet. Fibronektin ist als Glykoprotein der Extrazellularmatrix in allen Körperorganen, so auch in der Niere und in Knochen, präsent (Frantz et al., 2010). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die sogenannte prä-metastatische Nische im sekundären Organ, in die Tumorzellen zu einem späteren Zeitpunkt einwandern, bereits vor ihrer Ankunft mit Fibronektin angereichert und dadurch modifiziert wird (Valastyan und Weinberg, 2011). Diese Aufgabe kommt wahrscheinlich den Fibroblasten im Stroma des entsprechenden Organs zu, die durch Faktoren des primären Tumors zur Proliferation angeregt und aktiviert werden (Psaila und Lyden, 2009; Kaplan et al., 2006). In vorausgegangenen Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass sich Fibronektin in einer Konzentration von 10 µg/ml sehr gut eignet um NZK-Zellen chemotaktisch anzulocken (Schneider et al., 2010). In den hier durchgeführten Migrationstests migrierten NZK-Zellen von Patienten mit Knochenmetastasen wesentlich stärker in Richtung Fibronektin als NZK-Zellen von Patienten ohne oder mit Lungenmetastasen. Diese hohe Migrationsfähigkeit fördert das gesamtmetastatische Potenzial der Zellen und ist somit essentiell für die erfolgreiche Ausbildung der Knochenmetastasen. Zudem liefern die Ergebnisse einen weiteren Hinweis darauf, dass die organspezifische Metastasierung abhängig von der Zusammensetzung des Mikromilieus im sekundären Organ ist. Eine Anreicherung der Knochenmatrix mit Fibronektin – neben der Anreicherung mit Calcium – würde erklären weshalb bestimmte NZK-Zellen besonders häufig in dieses Organ migrieren, andere jedoch nicht.

Gelangen die NZK-Zellen in das Blutgefäßsystem werden sie im gesamten Körper verteilt. Der nächste Schritt beinhaltet die Selektion des sekundären Organs, in dem die Bildung einer Metastase stattfinden wird. Das Endothel der Kapillaren im Knochen ist stark fenestriert (Nguyen et al., 2009). Diese Struktur ist gut durchlässig für Tumorzellen und stellt somit keine große Barriere für die Tumorzellen dar. Entscheidend ist daher die Adhäsion der NZK-Zellen an die EZM des subendothelialen Knochengewebes. Mit ca. 90% ist Kollagen I die Hauptkomponente des Knochengewebes, Fibronektin gehört ebenfalls zu den Bestandteilen (Welsch, 2005; Nordahl et al., 1995; Globus et al., 1998). Auch in diesem Fall könnte eine Anreicherung der Matrix mit Fibronektin vor dem Eintreffen der metastasierenden Tumorzellen von Bedeutung sein (Valastyan und Weinberg, 2011). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass NZK-Zellen von Patienten mit Knochenmetastasen, verglichen mit nicht-metastasierenden und in Lungen metastasierenden Zellen, die größte Fähigkeit besitzen an Fibronektin und Kollagen I zu adhärieren. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass diese Zellen einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Zellen haben, sobald sie auf ihrem Weg durch das Blutgefäßsystem die Knochenmatrix erreichen. Hier können sie stärker als andere NZK-Zellen an die frei zugänglichen EZM-Komponenten der Knochen binden und eindringen. Ein ähnlicher Effekt wurde für andere Tumorentitäten, wie Melanomzellen, beobachtet und mit einer erhöhten Expression von Integrinen begründet (Muijen et al., 1995). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine erhöhte Expression der α 5-Integrine nachgewiesen (detaillierte Diskussion folgt in Abschnitt 4.3.2.1) und kann die verstärkte Adhäsionsfähigkeit der in Knochen metastasierenden Tumorzellen erklären. Weiterhin zeigte sich, dass alle untersuchten Zellen nicht in der Lage waren an Kollagen Typ IV zu binden - unabhängig davon, ob sie metastasierend oder nicht-metastasieren waren. Kollagen Typ IV ist im Gegensatz zu den anderen Kollagen-Typen nicht-fibrillär und in der Basallamina enthalten (Welsch, 2005). Für die Bindung an bestimmte Kollagen-Typen benötigen Zellen spezifische Integrin-Heterodimere. So binden α1β1-Integrine bevorzugt an Kollagen vom Typ IV und $\alpha 2\beta$ 1-Integrine bzw. $\alpha 11\beta$ 1-Integrine an Kollagen vom Typ I (Vogel, 2001). Ein Unterschied in der Integrinexpression der NZK-Zellen würde somit ebenfalls die ausbleibende bzw. sehr starke Adhäsion Kollagen Typ IV bzw. Typ I erklären.

Die Rolle der Adhäsion bei der Bildung von Metastasen ist jedoch umstritten. Im Gegensatz zu Muijen et al. konnte die Arbeitsgruppe um Schlüter in einem Mausmodell eine Korrelation zwischen dem Metastasierungspotenzial von Tumorzellen und ihrer Adhäsion an bestimmte sekundäre Organe ausschließen. Injizierte kolorektale Karzinomzellen arrestierten in ähnlich starker Frequenz in Lunge und Leber, unabhängig davon, ob sie metastasierend oder nicht-metastasierend waren (Schlüter et al., 2006).

Die Ergebnisse zeigen zudem, dass bereits in einem Erkrankungsstadium, in dem noch keine Hinweise auf eine Metastasierung vorlagen, bestimmte NZK-Zellen ein erhöhtes Migrationsund Adhäsionspotenzial besitzen. Bei den Patienten, aus deren Tumoren die Zellen kultiviert wurden, traten innerhalb von 5 Jahren nach Nephrektomie Knochenmetastasen auf. Die Tumorzellen im Primärtumor sind somit bereits zu diesem frühen Zeitpunkt dazu prädestiniert Metastasen in Knochen zu bilden. Dieses Phänomen konnte durch andere Arbeitsgruppen im Mammakarzinom beobachtet werden. Die Hintergründe hierfür beruhten auf genetischer Prädisposition. Patienten, deren Primärtumor ein bestimmtes Genexpressionsmuster aufwies, hatten ein erhöhtes Risiko zu einem späteren Zeitpunkt Metastasen auszubilden. Zu den hochregulierten Genen gehörten zum Beispiel Gene für Matrix-Metalloproteinasen, den VEGF-Rezeptor und Cykline (Veer et al., 2002; Vijver et al., 2002; Hynes, 2003).

Um aufzudecken, ob sich das in Knochen metastasierende NZK durch spezifische Expressions- und Aktivitätsmuster auszeichnet, die ein metastatisches Verhalten fördern, wurden folgend verschiedene Signalmoleküle in den primären NZK-Zellen und Gewebeproben von NZK-Patienten untersucht.

4.3.2 Charakteristisches Expressionsmuster: Verschiedene Signalmoleküle fördern die knochenspezifische Metastasierung von NZK-Zellen

Um die molekularen Hintergründe einer spezifischen Metastasierung von NZK-Zellen in Knochen aufzudecken, wurden insbesondere Signalmediatoren untersucht, die an der Regulation von Migration und Adhäsion beteiligt sind. Mit Hilfe der Identifizierung der beteiligten Signalwege sollte das zuvor beschriebene, Calcium-unabhängige veränderte metastatische Verhalten der NZK-Zellen von Patienten mit Knochenmetastasen erklärt werden. Hierbei stellte sich heraus, dass eine Überexpression von α5-Integrinen, eine starke Aktivität des FAK- und des Akt-Signalwegs und eine schwache Expression von PTEN die Bildung von Knochenmetastasen begünstigt. Zusätzlich zu den primären NZK-Zellen wurden Proben aus gesundem und malignem Nierengewebe von NZK-Patienten analysiert.

Tabelle 4.6:

Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressions-/ Aktivitätsanalysen primärer NZK-Zellen. Die Tabelle zeigt den Aktivierungsstatus bzw. die Expression verschiedener Signalmediatoren in NZK-Zellen von Patienten ohne bzw. mit Lungen- oder Knochenmetastasen. Zeichenerklärung: + = schwache Expression/Aktivität, + + = mittlere Expression/Aktivität, + + + = starke Expression/Aktivität, + + + = sehr starke Expression/Aktivität.

Expressionen	Integrin α5	pFAK	pAkt (S473)	pAkt (T308)	pShc	pErk	PTEN	Nedd 4.1
keine Metastasen	+	+	+	++	+++	+++	+++	++
Lungenmetastasen	++	+	++	+++	+	+	+	+
Knochenmetastasen	++++	++++	++++	++	+	+	+	+++

Tabelle 4.7:

Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressions-/ Aktivitätsanalysen von NZK-Gewebeproben.

Die Tabelle zeigt die Expression bzw. den Aktivierungsstatus verschiedener Signalmediatoren in Normal- und Tumorgewebe von NZK-Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsorten. Zeichenerklärung: + = schwache Expression/Aktivität, + + = mittlere Expression/Aktivität, + + = starke Expression/Aktivität, + + + = sehr starke Expression/Aktivität.

Expressionen Normalgewebe	Integrin α5	pFAK	pAkt (S473)	pShc	pErk	PTEN
keine Metastasen	+	+++	+	+++	+	+++
Lungenmetastasen	++	+	++	+	++	++
Knochenmetastasen	+++	++	+++	++	+++	+
Expressionen Tumorgewebe	Integrin α5	pFAK	pAkt (S473)	pShc	pErk	PTEN
keine Metastasen	+	++	+	+++	+	++
Lungenmetastasen	+++	++	+	+	+++	++
Knochenmetastasen	++++	+	++	+	+ +	+



Abbildung 4.3:

Schematische Darstellung der molekularen Mechanismen, die eine knochenspezifische Metastasierung von NZK-Zellen fördern.

Eine Überexpression von Integrinen und Wachstumsfaktorrezeptoren (RTK) führt in knochenmetastasierenden NZK-Zellen zu einer verstärkten Aktivierung des FAK- und PI3K/Akt-Signalwegs. Ein reduziertes Vorhandensein des Antagonisten PTEN verstärkt die Signalwege weiter. Interaktionen von Rho-GTPasen mit WAS-Proteinen sind die Folge. Dies resultiert in einer Umstrukturierung des Zytoskeletts und Bildung neuer Fokalkontakte und einer damit einhergehenden erhöhten Migration und Adhäsion der NZK-Zellen.

4.3.2.1 Überexpression von α5-Integrinen

Integrinen kommt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der gerichteten Migration und der Zell-Matrix-Adhäsion zu. Das Heterodimer aus einem α 5-Integrin und einem β 1-Integrin bildet Fokalkontakte aus, die eine spezifische Bindung der Zellen an die EZM-Komponente Fibronektin ermöglichen (Brakebusch und Fässler, 2005; Flier und Sonnenberg, 2001). In dieser Arbeit konnte ein besonders deutlicher Unterschied in der Expression der α 5-Integrine in den unterschiedlichen NZK-Zellen und –Gewebeproben detektiert werden (Tabellen 4.6 und 4.7). Während diese in Tumorzellen und Gewebeproben von Patienten ohne Metastasen nur schwach exprimiert waren, zeigten Tumorzellen und Gewebeproben aus Patienten mit Lungen- und Knochenmetastasen eine erhöhte Expression der α 5-Integrine einher. Die

Expressionsunterschiede im Tumorgewebe zeigten dabei Signifikanz auf. Auf Grund dieser Ausstattung können die in Knochen metastasierenden Zellen mehr Fokalkontakte zu Fibronektin ausbilden, was ihnen zu einer verstärkten Migrations- und Adhäsionsfähigkeit verhilft (Abbildung 4.3).

In vorausgegangenen Analysen unserer Arbeitsgruppe konnte in durchflusszytometrischen Analysen gezeigt werden, dass kontinuierliche NZK-Zelllinien von Patienten mit Knochenmetastasen β 1-Integrine exprimieren, jedoch nicht β 2- und β 3-Integrine (Brenner et al., 2010). Somit besitzen NZK-Zellen die passenden Integrine um ein Heterodimer für die Bindung an Fibronektin auszubilden. In weiteren Analysen unserer Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass
ß1-Integrine die Migration von Tumorzellen aus dem NZK regulieren (Brenner et al., 2008). Da β 1-Integrine auch benötigt werden, um Fokalkontakte zu Kollagen I auszubilden (Barczyk et al., 2010), erklärt das Expressionsmuster der Integrine nicht nur die verstärkte Migration und Adhäsion bezüglich Fibronektin, sondern auch die verstärkte Adhäsion an Kollagen I der in Knochen metastasierenden Zellen (Abbildung 4.3). Es gibt verschiedene Untersuchungen, die einen Zusammenhang zwischen Integrinexpression und Tumorprogression bzw. Metastasierung zeigen, wie er auch in der vorliegenden Arbeit auftrat. Terpe et al. konnten beobachten, dass die Expression der av- und a5-Integrine mit dem Tumorgrad korrelierten (Terpe et al., 1993). Dieser Zusammenhang wurde ebenfalls für andere Tumorentitäten beschrieben. In Mamma- und Ovarialkarzinomzellen kommt es zur Überexpression der β1-Integrine (Arbodela et al., 2003). Die Arbeitsgruppe um Spangenberg wies ein längeres Überleben von Mammakarzinomzellen durch Überexpression des α5β1-Heterodimers nach (Spangenberg et al., 2006). Für die Adhäsion von Prostatakarzinomzellen wurde eine Abhängigkeit ihrer Fähigkeit an die Matrix zu binden von den Integrinen beobachtet (Cooper und Piente, 2000). In diesen Arbeiten wurde jedoch nur die allgemeine Metastasierung berücksichtigt, nicht der Zusammenhang zwischen Integrinexpression und Lokalisation der Metastasen in bestimmten Organen, wie etwa den Knochen.

4.3.2.2 Starke Aktivität des FAK- und Akt-Signalwegs

Wie bereits in Abschnitt 1.2.2 beschrieben, kommt es nach Aktivierung durch Bestandteile der EZM zu einer Konformationsänderung der Integrine, die in einer Signalweiterleitung in die Zelle resultiert. Integrine aktivieren zwei intrazelluläre Signalwege, die parallel zueinander verlaufen: den FAK und den Shc-Signalweg. Beide Signalwege initiieren die MAPK-Signalkaskade. FAK reguliert zudem den PI3K/Akt-Signalweg (Krauss, 2003; Tamura et al., 1999; Ravichandran, 2001). Passend zur Expression von Integrin α5 lagen in NZK-Zellen mit hohem Potenzial zur Knochenmetastasierung FAK und Akt verstärkt aktiviert vor (Tabelle 4.6). Dagegen kam es in metastasierenden NZK-Zellen zu einer deutlichen Reduktion der Aktivität von Shc, sowie der nachgeschalteten MAP-Kinase Erk. Dieses Aktivitätsmuster zeigt, dass in Knochen-metastasierenden NZK-Zellen die Signalweiterleitung der Integrine über FAK und den nachgeschalteten PI3K/Akt-Signalweg verläuft und in einer gesteigerten Migration und Adhäsion resultiert. Es besteht jedoch keine Signalweiterleitung über Shc und die MAPK-Signalkaskade (Abbildung 4.3).

FAK reguliert nicht nur die MAPK-Kaskade und den Akt-Signalweg. Über p130^{CAS} nimmt es zudem direkten Einfluss auf Migration und Adhäsion (Abbildung 4.3). FAK interagiert mit p130^{CAS} zu einem Komplex (Polte und Hanks, 1995). Die Aktivierung des FAK/p130^{CAS}-Komplexes führt zur Ausbildung vieler Fokalkontakte und eines gut organisierten Aktinzytoskeletts. Diese Regulierung ist essentiell für die koordinierte und gerichtete Migration von Zellen (Gu et al., 1999). In verschiedenen Tumorentitäten, wie dem Pankreas-, Kolon-, Lungen- und Mammakarzinom, liegt eine generelle Überexpression von FAK vor (Ucar und Hochwald, 2010; Golubovskaya et al., 2009; Meng et al., 2009). Im Ösophagus-, Kolon- und Leberzellkarzinom geht sogar das Potenzial zur Metastasenbildung mit einer Überexpression von FAK einher (Miyazaki et al., 2003; Heer et al., 2008; Chen et al., 2010). Die Ergebnisse dieser Arbeit fügen sich somit gut in bereits zuvor gemachte Beobachtungen. Es muss jedoch beachtet werden, dass auch in diesem Punkt in den Arbeiten anderer Forschergruppen der Ort der Metastasierung unberücksichtigt blieb und nur die Metastasierung im Allgemeinen betrachtet wurde.

Der PI3K/Akt-Signalweg ist dafür bekannt maßgeblich an der Regulation von Migration, Adhäsion und Proliferation beteiligt zu sein. Im Falle einer Fehlregulation bzw. verstärkter Aktivierung werden Tumorprogression und Metastasierung begünstigt (Hers et al., 2011; Bellacosa et al., 2004). Der Einfluss auf Migration und Adhäsion kommt über Rho-GTPasen zustande. Sie leiten das Signal weiter und regulieren die Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts und Bildung neuer Fokalkontakte (Yamada und Araki, 2001; Enomoto et al., 2005; Yamazaki et al., 2005). Auf Grund dieser Mechanismen lässt sich das beschriebene metastatische Verhalten der NZK-Zellen erklären. In metastasierenden NZK-Zellen mit Knochen-spezifischer Metastasierung kommt es durch eine verstärkte Akt-Aktivierung zur Hochregulation der hier genannten nachgeschalteten Moleküle (Tabelle 4.6). Die nun ausgelösten Mechanismen führen zur hohen Adhäsions- und Migrationsfähigkeit der Zellen und schließlich zur Bildung von Knochenmetastasen (Abbildung 4.3). Der Nachweis einer hohen Akt-Aktivität in den Gewebeproben von Patienten mit Knochenmetastasen korrelierte mit den Ergebnissen der Expressionsanalysen der NZK-Zellen (Tabelle 4.7).

Neben der indirekten Aktivierung durch Integrine kann der Akt-Signalweg auch direkt von Wachstumsfaktorrezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität (RTK) angeschaltet werden. Es gibt viele Hinweise, die auf einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten RTK-Expression bzw. –Aktivität, Tumorwachstum und Metastasierung hindeuten. Von mehreren Arbeitsgruppen wurden Überexpressionen der Rezeptoren für EGF und TGF-β im NZK beschrieben (Paule und Brione, 2003; Yang et al., 2010). Im Schilddrüsenkarzinom wird eine erhöhte EGFR-Expression mit einer verstärkten Vaskularisierung und Knochenmetastasierung assoziiert (Younes et al., 2005). Zudem wird der Rezeptor als mögliche Zielstruktur im NZK für eine Therapie gegen Knochenmetastasierung diskutiert (Weber et al., 2003). Die für das NZK charakteristische VHL-Mutation führt zu einer verstärkten Expression von VEGF und PDGF, die in einer erhöhten Aktivität der RTK resultieren (Arjumand und Sultana, 2012). Hieraus lässt sich schließen, dass der Akt-Signalweg im Knochen-metastasierenden NZK parallel durch Integrine und RTK verstärkt aktiviert wird (Abbildung 4.3).

In der Analyse der Gewebeproben hinsichtlich FAK und Erk wurde ein anderes Aktivitätsmuster detektiert als in primären NZK-Zellen. Im Gegensatz zu den Zellen lag FAK in Gewebeproben aus Patienten mit Knochenmetastasen vermindert aktiv vor. Die Aktivität von Erk war in diesem Gewebetyp höher als im Gewebe von Patienten ohne Metastasen (Tabelle 4.7). Bei der Untersuchung von Proteinextrakten aus Gewebeproben von Patienten muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Proben nicht ausschließlich maligne Epithelzellen enthalten. Im Gegensatz zu den primären NZK-Zellen, die auf ihren epithelialen Ursprung hin getestet worden waren, enthalten Gewebeproben neben den Epithelzellen andere Zelltypen wie Fibroblasten und Endothelzellen. Mit dieser Heterogenität lässt sich der Unterschied im Aktivitätsmuster der Kinasen zwischen Gewebe- und Zellanalysen erklären.

4.3.2.3 Schwache PTEN-Expression

Der Tumorsuppressor PTEN agiert als Inhibitor des FAK- und des PI3K/Akt-Signalwegs. PTEN wirkt über Dephosphorylierung von FAK und von Lipiden (PIP₃), die zur Rekrutierung von Akt an die Zellmembran in die Nähe seines Aktivators benötigt werden. In gesunden Zellen inhibiert PTEN auf diese Weise Prozesse wie Migration, Adhäsion und Proliferation (Maehama et al., 1999; Kölsch et al., 2008). In malignen Erkrankungen ist eine Reduktion der PTEN-Expression weit verbreitet (Li et al., 1997). Dies konnte durch frühere Forschungsarbeiten in unserem Labor auch für das NZK gezeigt werden. Im NZK fehlt daher die tumorsuppressive Wirkung von PTEN (Brenner et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte zudem bezüglich der Metastasierung ein typisches PTEN-Expressionsmuster detektiert werden. In Tumorgewebe und NZK-Zellen von Patienten mit Knochenmetastasen lag PTEN, verglichen mit solchen von Patienten ohne Metastasen, deutlich reduziert vor (Tabellen 4.6 und 4.7). Dies ist ein Nachweis dafür, dass ein reduziertes Vorkommen von PTEN und die damit verbundene verstärkte Aktivierung des Akt- und FAK-Signalwegs die Migration und Adhäsion der NZK-Zellen fördert (Abbildung 4.3). Ein ähnlicher Zusammenhang wurde bereits für die Metastasierung anderer Tumortypen festgestellt, jedoch ohne Berücksichtigung der Organspezifität. Erst kürzlich wurde durch Wikman et al. ein Zusammenhang zwischen dem Verlust von PTEN und dem Auftreten von Metastasen des Mammakarzinoms beschrieben (Wikman et al., 2012). Der Verlust von PTEN wird außerdem als möglicher prognostischer Marker für die Metastasierung im Laufe der Erkrankung an einem Prostatakarzinoms diskutiert (Schmitz et al., 2007).

Im Rahmen einer dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit wurden Expressionsanalysen von NZK-Zellen durchgeführt, die einen Hinweis auf einen direkten Zusammenhang zwischen PTEN und der Regulation der Integrinexpression gaben. Durch eine Transfektion von NZK-Zellen, die kein PTEN besitzen, mit einem PTEN-Transgen konnte eine Reduktion der Expression von α 5-Integrinen beobachtet werden, die in einer Abschwächung der Zellmigration resultierte. Dieser Effekt trat bei Transfektion von inaktivem PTEN nicht auf (Schneider, 2008). In metastasierenden NZK-Zellen könnte somit durch reduziertes PTEN nicht nur der Akt- und FAK-Signalweg, sondern auch die Bildung von Fokalkontakten durch α 5-Integrine gefördert werden.

Zur Aufklärung der Reduktion von PTEN wurde die Expression von Nedd4.1 untersucht. Nedd4.1 ist die Ubiquitinligase für PTEN und für dessen proteasomalen Abbau verantwortlich (Wang et al., 2007). Wäre Nedd4.1 in metastasierenden NZK-Zellen für die PTEN-Reduktion verantwortlich, würde man in diesen Zellen eine gesteigerte Nedd4.1-Expression erwarten. Dies war jedoch nicht der Fall. In Zellen von Patienten mit Knochenmetastasen konnte zwar eine leichte Steigerung von Nedd4.1 detektiert werden,
dagegen kam es in Zellen mit Potenzial zur Lungenmetastasierung zur Reduktion von Nedd4.1 (Tabelle 4.6). Aus diesem Grund ist eine verstärkte Degradation von PTEN durch eine erhöhte Nedd4.1-Expression auszuschließen. Es muss eine Regulation auf transkriptioneller Ebene durch Transkriptionsfaktoren und/oder durch epigenetische Veränderungen bezüglich Methylierungen in der Promotorregion in Betracht gezogen werden. Auf transkriptioneller Ebene wird das PTEN-Gen negativ durch TGF^β reguliert (Chow et al., 2008). Da im NZK eine Überexpression der TGFβ-Rezeptoren vorliegen kann (Yang et al., 2010), könnte es zur Reduktion von PTEN beitragen. Zu den Transkriptionsaktivatoren von PTEN zählt der Tumorsuppressor p53, dessen Expression in vielen Tumorarten, so auch im NZK, häufig verändert vorliegt (Kim und Mak, 2006; Soussi und Lozano, 2005; Girgin et al., 2001; Warburton et al., 2005). Eine Reduktion von p53 könnte zu vermindert vorhandenem führen. Eine Reduktion der PTEN-Expression durch Methylierungen im PTEN Promotorbereich des PTEN-Gens ist ein häufiges Auftreten in unterschiedlichen Tumorarten, wie im Mamamkarzinom, Ovarialkarzinom, Magenkarzinom und im Kolonkarzinom (Sadeq et al., 2011; Schöndorf et al., 2004; Hino et al., 2009; Goel et al., 2004) und muss aus diesem Grund ebenfalls berücksichtigt werden.

Die Analyse der Gewebeproben ergab, dass das charakteristische Expressions- bzw. Aktivitätsmuster der α 5-Integrine, Akt und PTEN auch in gesundem Nierenepithel vorliegt. Bestimmte Nierenepithelzellen weisen somit bereits vor der NZK-Erkrankung Eigenschaften auf, die eine spätere Metastasierung in Knochen begünstigen, sie sind dazu prädestiniert. Es muss jedoch beachtet werden, dass die Proben zur gleichen Zeit aus dem benignen und malignen Gewebe der Niere entnommen wurden. Daher könnten die charakteristischen Expressionsmuster der Signalwege auch erst durch Anwesenheit eines NZK-Primärtumors induziert worden und vor der NZK-Erkrankung noch unverändert gewesen sein. Die Expressionsmuster in der gesunden Niere würden dann noch keine Aussage über die organspezifische Metastasierung machen, sondern erst das veränderte Expressionslevel im Tumor.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Calcium-unabhängige und Calcium-abhängige Effekte gemeinsam die Bildung von NZK-Knochenmetastasen begünstigen. Bereits im Primärtumor besitzen die in Knochen-metastasierende NZK-Zellen ein charakteristisches Expressionsmuster verschiedener Signalmoleküle, das ihre metastatischen Eigenschaften verstärkt. Gegenüber nicht-metastasierenden Zellen besitzen sie größere Fähigkeiten den Primärtumor zu verlassen und nach der Verteilung durch das Blutkreislaufsystem an die Knochenmatrix zu binden und sie zu infiltrieren. Diese Eigenschaften sind per se und unabhängig von der extrazellulären Calcium-Konzentration vorhanden. Im Mikromilieu des Knochens kommt es durch die Wirkung von Calcium über den CaSR auf die metastasierenden NZK-Zellen zu einer weiteren Verstärkung ihrer Fähigkeiten zur Bildung von Knochenmetastasen. Die Zellen werden nach Aktivierung verschiedener Signalmoleküle durch Calcium via CaSR nicht nur chemotaktisch von diesem angelockt. Calcium begünstigt außerdem die Proliferation und somit die Ausbildung eines sekundären Tumorzellverbands außerhalb des Primärtumors. Aus diesem Grund haben NZK-Zellen mit erhöhter Expression des CaSR im Knochenmilieu einen erheblichen Vorteil gegenüber anderen NZK-Zellen. Dies unterstreicht seine mögliche Rolle als prognostischer Marker für die Ausbildung von Knochenmetastasen. Die einzigartige Ausstattung der Zellen bestimmt somit in erheblichem Ausmaß die spätere Lokalisation der Metastase. Durch entsprechende Untersuchungen könnten schon vor dem Auftreten von Metastasen Voraussagen darüber gemacht werden, ob bei einer NZK-Metastasierung Knochen betroffen sein könnten. Die Charakteristika des Primärtumors könnten die Auswahl der und die Intervalle Therapie der Nachsorgeuntersuchungen bestimmen und die Medizin dem Ziel einer individualisierten Therapie näher bringen.

4.4 Metastasierungs-Charakteristika der primären NZK-Zellen lassen sich teilweise auf kontinuierliche NZK-Zelllinien übertragen

Die begrenzte Verfügbarkeit primärer Zellen stellt ein erhebliches Problem dar. Aus diesem Grund sollte in nachfolgenden Untersuchungen überprüft werden, ob die bisher erzielten Ergebnisse auf kontinuierliche Zelllinien übertragbar sind. Wäre dies zutreffend, könnte man in weiteren Analysen bezüglich organspezifischer Metastasierung auf kontinuierliche Zelllinien ausweichen. Es wurden speziell Zelllinien ausgesucht, die sich ebenfalls in ihrem metastatischen Potenzial unterscheiden. Die Zelllinie A-498 stammt aus einem Patienten ohne Metastasen (Giard et al., 1973), die Zelllinie 786-O aus einem Patienten mit Lungenmetastasen (Strewler et al., 1983). Die Patienten aus denen die Zelllinien RC-1 und Dibo kultiviert wurden, entwickelten Knochenmetastasen (Hashimura et al., 1989; eigene Klinikdaten).

Das Muster der CaSR-Expression war teilweise mit dem in primären NZK-Zellen vergleichbar. Die stärkste Expression war in Dibo messbar (Tabelle 4.8). RC-1 exprimierten

den Rezeptor ebenfalls. In gleichem Maße war er in den nicht-metastasierenden A-498 Zellen vorhanden. In 786-O Zellen mit Fähigkeit in Lungen zu metastasieren, war kein CaSR detektierbar.

Tabelle 4.8:

Zusammenfassung der Ergebnisse der CaSR-Expressionsanalyse, der Zellmigration und -proliferation der kontinuierlichen NZK-Zellen.

Die Tabelle zeigt CaSR-Expression, die Migrationsfähigkeit der NZK-Zelllinien A-498 (nicht-metastasierend), 786-O (in Lungen metastasierend), Dibo und RC-1 (in Knochen metastasierend) unter Verwendung von Fibronektin und Calcium als Chemotaxin und die Proliferationsfähigkeit nach Behandlung mit Calcium in unterschiedlichen Konzentrationen (2,5 mM, 5 mM, 10 mM). Zeichenerklärung: 0 = keine Migration/Proliferation, + = schwache Migration/Proliferation, + + = mittlere Migration/Proliferation, + + = starke Migration/Proliferation.

Expression	CaSR	Migration	Fibro- nektin	Calcium	Proliferation	un- behandelt	2,5 mM Calcium	5 mM Calcium	10 mM Calcium
A-498	+	A-498	++	+	A-498	+	+	+	+
786-0	0	786-0	++++	0	786-0	+	+	+	+
Dibo	++	Dibo	++++	+++	Dibo	+	++	+++	++++
RC-1	+	RC-1	++++	++	RC-1	+	++	+	++

Das Expressionsmuster des CaSR korrelierte mit der Fähigkeit der Zellen in Richtung einer erhöhten Calcium-Konzentration zu migrieren. Je höher die CaSR-Expression der Zellen, desto stärker wurden sie chemotaktisch von Calcium angelockt. Dibo und RC-1 zeigten in diesem Fall das größte migratorische Potenzial (Tabelle 4.8). Die Zelllinie 786-O, die nicht im Besitz des CaSR ist, konnte durch Calcium quasi nicht zur Motilität gebracht werden. Ein ähnliches Ergebnis ergab die Untersuchung der Proliferation. Hier konnte durch Calcium ausschließlich die Proliferationsrate von Dibo und RC-1 gesteigert werden (Tabelle 4.8). Dies entsprach ihrer CaSR-Expression. A-498 Zellen konnten dagegen nicht zu einer verstärkten Proliferation angeregt werden, obwohl sie im Besitz des CaSR sind. Bezüglich der Calciumunabhängigen Migration mit Fibronektin als Chemotaxin entsprach die beobachtete Migration der Zellen ihrem Metastasierungspotenzial. Zelllinien von Patienten mit Metastasen (786-O, Dibo, RC-1) wiesen verglichen mit der Zelllinie A-498 eine deutlich höhere Migrationsrate auf. Dies entspricht dem Migrationsverhalten der primären NZK-Zellen.

Neben dem zellulären Verhalten wurden Signalwege analysiert, die in primären NZK-Zellen in Abhängigkeit von ihrem Metastasierungspotenzial und dem Einfluss von Calcium Veränderungen aufzeigten. Auch in diesem Fall zeichneten sich metastasierende NZK-Zelllinien besonders durch ihre erhöhte Expression von α 5-Integrinen aus (Tabelle 4.9). In der nicht-metastasierenden Zelllinie A-498 lag die Menge an α 5-Integrinen vergleichsweise gering vor. Die Intensität der Expression entsprach somit der Fähigkeit der Zellen chemotaktisch von Fibronektin angelockt zu werden. Wie bereits in Abschnitt 4.1.2.1 beschrieben, werden α 5-Integrine benötigt um zusammen mit β 1-Integrinen Fokalkontakte zu bilden. Über diese Fokalkontakte kommt die Bindung an den EZM-Bestandteil Fibronektin zustande. Je mehr α 5-Integrine von den Zellen exprimiert wird, desto besser können sie mit der EZM interagieren.

Tabelle 4.9:

Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressionsanalysen kontinuierlicher NZK-Zelllinien.

Die Tabelle zeigt die Expression bzw. den Aktivierungsstatus verschiedener Signalmediatoren. Es wurden die NZK-Zelllinien A-498 (nicht-metastasierend), 786-O (in Lungen metastasierend), Dibo und RC-1 (in Knochen metastasierend) unbehandelt und nach Calcium-Behandlung untersucht. Zeichenerklärung: 0 = keine Expression/Aktivität, + = schwache Expression/Aktivität, + + = mittlere Expression/Aktivität, + + = starke Expression/Aktivität, + + + = sehr starke Expression/Aktivität.

Expressionen		Integrin α5	pFAK	pAkt (S473)	pShc	pErk	PTEN
unbehande		++	+	+++	+++	++	++++
A-490	Calcium	+	+	+++	+++	+++	++
700.0	unbehandelt	+++	++++	+++	+++	++	0
766-0	Calcium	+++	+++	+++	+++	++	0
Diha	unbehandelt	++++	++	++	+++	++	+++
Dibo	Calcium	++++	+++	+++	+++	++	++
RC-1	unbehandelt	++++	+++	+	++	+	++
	Calcium	++++	++++	++	++	++	+

Das unterschiedliche Metastasierungspotenzial der primären NZK-Zellen konnte durch eine veränderte Aktivität des Akt- und FAK-Signalwegs erklärt werden. In metastasierenden primären Zellen war die Aktivität beider Kinasen hochreguliert. Eine verstärkte Phosphorylierung von Akt wurde in kontinuierlichen Zelllinien nicht nachgewiesen. Jedoch lag in metastasierenden kontinuierlichen Zelllinien FAK deutlich verstärkt aktiviert vor (Tabelle 4.9). Wie bereits in Abschnitt 4.3.2.2 erläutert wurde, reguliert FAK nicht nur die MAPK-Signalkaskade und den Akt-Signalweg. FAK nimmt zudem über p130^{CAS} direkten Einfluss auf die Migration. Die gesteigerte Metastasierungsfähigkeit der kontinuierlichen NZK-Zelllinien 786-O, RC-1 und Dibo lässt sich daher durch eine erhöhte Integrin α 5-Expression und einer damit verbundenen positiven Regulation der Migration über FAK-Aktivierung erklären. Durch die Expressionsanalysen an primären Zellen konnte ein Beitrag von Shc und Erk zur unterschiedlichen Metastasierungsfähigkeit ausgeschlossen werden. Dies

trifft auch auf kontinuierliche NZK-Zellen zu. Die Aktivität der Proteine war in den unterschiedlichen Zellen nahezu unverändert bzw. in metastasierenden Zellen leicht reduziert (Tabelle 4.9). Das Expressionsmuster des Tumorsuppressor PTEN war in primären und kontinuierlichen NZK-Zellen ebenfalls vergleichbar. In allen untersuchten metastasierenden Zellen lag PTEN verglichen mit nicht-metastasierenden NZK-Zellen reduziert vor (Tabelle 4.9). Eine Reduktion von PTEN hatte in den Zellen die verstärkte FAK-Aktivierung und Zellmigration zur Folge, da PTEN ein Inhibitor von FAK ist.

Calcium führte in den kontinuierlichen NZK-Zellen mit Potenzial in Knochen zu metastasieren hauptsächlich zu einer stärkeren Aktivierung von FAK und Akt und zu einer leichten Reduktion von PTEN (Tabelle 4.9). Diese Veränderungen erklären die durch Calcium gesteigerte Migrations- und Proliferationsfähigkeit. Sobald die NZK-Zellen in das Calcium-reiche Knochenmilieu gelangen, werden Signalwege verstärkt aktiviert, die in einer Förderung von Adhäsion, Migration und Proliferation resultieren bzw. wird deren Gegenspieler PTEN weiter reduziert. Diese Ergebnisse entsprachen ebenfalls den gemessenen Aktivitätsmustern in primären NZK-Zellen. Da die Zelllinie 786-O nicht im Besitz des CaSR ist, konnte Calcium keinen Einfluss auf intrazelluläre Signalwege nehmen. Die Expression bzw. Aktivität der Proteine blieb unberührt. Ein Einfluss auf die Expression von PTEN kann in der Zelllinie 786-O nicht beurteilt werden, da sie PTEN per se nicht exprimiert. In der Zelllinie A-498 förderte Calcium nicht die Aktivierung von FAK und Akt. Dagegen war eine verstärkte Aktivität der MAP-Kinase Erk zu beobachten. In A-498 Zellen wird die Migration in Richtung Calcium somit über Aktivierung des Erk-Signalwegs reguliert.

Auf Grund der unerwarteten Expression des CaSR ist die nicht-metastasierende Zelllinie A-498 nicht vollständig mit den primären NZK-Zellen aus Patienten ohne Metastasen zu vergleichen. Es besteht die Möglichkeit, dass die CaSR-Expression erst im Laufe der langjährigen Kultivierung der Zellen hochreguliert wurde und direkt nach Entnahme der Zellen aus dem Primärtumor noch nicht bestand. Zudem ist zu bemerken, dass der Patient, aus dem die Zellen kultiviert wurden, verstorben sein könnte, bevor sich mögliche Knochenmetastasen bemerkbar gemacht haben. In diesem Fall wären sie unentdeckt geblieben und das Expressions- und Verhaltensmuster der Zelllinie A-498 würde zum Teil ihrem Metastasierungspotenzial entsprechen. Es kann für die kommerziell erhältliche Zelllinie jedoch nicht nachvollzogen werden.

4.5 Die Effekte der Tyrosinkinaseinhibitoren auf unterschiedliche NZK-Zelllinien sprechen für eine individualisierte Therapie des metastasierten NZK

Bei der Behandlung des metastasierten NZK kommen vor allem die Tyrosinkinaseinhibitoren Sunitinib, Sorafenib und Pazopanib zum Einsatz. Sie blockieren unterschiedliche Tyrosinkinasen und unterbinden somit deren Signalweiterleitung. Vor allem über Inhibition der Kinasedomänen des VEGF- und des PDGF-Rezeptors wirken sie den Prozessen der Metastasierung entgegen. Sorafenib wirkt zusätzlich durch Hemmung der den Rezeptoren nachgeschalteten Raf-Kinase weiter "downstream" in der Signalkaskade. Bisher konnten jedoch noch nicht alle Kinasen identifiziert werden, die durch eine TKI-Therapie beeinflusst werden (Merseburger und Kuczyk, 2008). Zur Aufdeckung der genauen Wirkweisen der TKI kommt erschwerend hinzu, dass die unterschiedlichen TKI kein identisches Wirkspektrum abdecken. Auf Grund der fehlenden Informationen ist es nicht möglich eine exakt auf den Patienten abgestimmte Therapie anzuwenden. Derzeit bekommen alle Patienten, die an einem metastasierten NZK erkranken, eine adjuvante Target Therapie nach dem gleichen Schema (beschrieben in Abschnitt 1.1.5.3 und in Tabelle 1.1). Um dem Ziel einer individualisierten Target Therapie näher zu kommen, müssten die unterschiedlichen Expressionsprofile der einzelnen Patienten in die Auswahl des optimalen Therapeutikums einfließen. Es sind bisher einige prognostische Marker des NZK bekannt. Diese müssten um weitere ergänzt werden, vor allem um solche, die charakteristisch für Metastasierung und die hierbei betroffenen Organe sind (Merseburger und Kuczyk, 2008; Jones und Libermann, 2007). Derzeit wird sogar diskutiert, ob es sinnvoll ist, von jedem Patienten eine NZK-Primärzellkultur anzulegen, um an ihr die Wirkweisen der einzelnen Target-Therapeutika auszutesten. Anhand des zellulären Verhaltens und des Expressionsprofils könnte die optimale Behandlung analysiert werden (Kim et al., 2008). Zudem sollte die organspezifische Metastasierung berücksichtigt werden. Hinweise hierauf geben die Forschungsergebnisse der Arbeitsgruppe um Cabanillas. Sie machten bei der Untersuchung des metastasierten Schilddrüsenkarzinoms die Entdeckung, dass die Metastasen in den einzelnen Organen unterschiedlich auf eine Behandlung mit den TKI ansprechen. So zeigten Lungenmetastasen eine bessere Ansprechrate als Lymphknotenmetastasen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Erfolg einer TKI-Behandlung von der Lokalisation der Metastase abhängig, die Wirkung also gewebespezifisch ist (Cabanillas et al., 2010).

In den durchgeführten Untersuchungen sollte geklärt werden, ob die Metastasierungsfähigkeiten und die Organspezifität der NZK-Zellen ebenfalls den Behandlungserfolg der TKI beeinflussen. Es zeigte sich, dass die NZK-Zellen in ihrem Verhalten sehr unterschiedlich auf die TKI reagierten. Die nicht-metastasierende NZK-Zelllinie A-498 wurde in ihrer Fähigkeit zu migrieren ausschließlich durch Sorafenib effektiv gehemmt. Dieses Ergebnis ist auf die Zelllinie Dibo übertragbar, obwohl sie aus einem Patient mit Knochenmetastasen entstammt und ohne TKI-Behandlung ein anderes Verhaltens- und Expressionsmuster aufweist. Die Migration der metastasierenden NZK-Zelllinien RC-1 und 786-O wurde ebenfalls am stärksten durch Sorafenib gehemmt. Die Zellen sprachen zudem gut auf eine Behandlung mit Sunitinib an, obwohl sie sich ebenfalls in ihrem Verhaltens- und Expressionsmuster ohne TKI-Behandlung unterschieden. Eine Behandlung mit Pazopanib scheint im Vergleich zu Sunitinib und Sorafenib äußerst ineffizient in ihrer Wirkung auf die Tumorzellen. Die Migrationsfähigkeit aller Tumorzellen konnte nur schwach beeinflusst werden. Pazopanib zeigte lediglich auf die Proliferationsfähigkeit von 786-O einen deutlich hemmenden Effekt. Bezüglich der Hemmung der Zellproliferation war auch Sunitinib nicht sehr effektiv. Hierbei stellte sich Sorafenib als der TKI mit der besten Wirkung heraus. Er inhibierte die Proliferation Zellen in gleicher Weise.

Die Ergebnisse zeigen, dass die NZK-Zellen unterschiedlich auf die verschiedenen TKI reagieren. Bezüglich der durchgeführten funktionellen Tests konnten keine Zusammenhänge zwischen dem Behandlungserfolg mit einzelnen TKI und dem Metastasierungspotenzial der Zellen bzw. der Lokalisation der Metastase im Patienten gefunden werden. Mit Blick auf die organspezifische Metastasierung und der zuvor aufgedeckten unterschiedlichen Verhaltensund Expressionsmuster scheint die Behandlung eher unspezifisch zu sein und lässt sich nicht pauschalisieren. Da die primären NZK-Zellen teilweise ähnliche Charakteristika aufwiesen, könnten sich die Vermutungen auf diese Zellen übertragen lassen, müssen jedoch in zusätzlichen Untersuchungen überprüft werden. Eine Therapie nach standardisiertem Schema, in dem Sunitinib als Erstlinientherapeutikum zum Einsatz kommt, scheint – was die Reaktion der NZK-Zellen betriff – nicht die optimale Lösung zu sein, da einige Zellen beispielsweise ein besseres Ansprechen auf Sorafenib zeigten. Dies spricht dafür, dass die molekularen Charakteristika der Primärtumore, die ihr Metastasierungspotenzial und die Lokalisation der Metastasen beeinflussen, in die Auswahl des Target-Therapeutikums einbezogen werden sollten, um die Therapie effizienter zu gestalten. Somit könnten größere Behandlungserfolge und reduzierte Nebenwirkungen erzielt werden. Zu bemerken ist, dass das eigentlich Ziel der Target-Therapie eine Inhibition der Vaskularisierung des Primärtumors durch die Endothelzellen ist. Dieser Aspekt muss somit ebenfalls bei der Auswahl des Therapeutikums berücksichtigt werden.

4.6 Ausblick

Die Untersuchungen bezüglich der Rolle des CaSR und Calciums bei der organspezifischen Metastasierung in Knochen wurden an einer begrenzten Anzahl von Proben durchgeführt. Um die Ergebnisse zu verifizieren, wäre es ratsam, die Anzahl der NZK-Gewebeproben sowie der primären NZK-Zellen aus Patienten mit unterschiedlichem Metastasierungsstatus zu erhöhen.

Die Ursache für die unterschiedliche Expression des CaSR in den NZK-Gewebeproben und in NZK-Zellen von Patienten mit unterschiedlichem Metastasierungsstatus konnte in dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Zwar konnte Calcium als ein möglicher Faktor ausgeschlossen werden, welche Regulatoren schließlich in Frage kommen bleibt unklar. In der Literatur wird Calcitriol häufig als positiver Regulator des CaSR beschrieben. Aus diesem Grund sollte zunächst untersucht werden, ob die Menge des im NZK vorhandenen Calcitriol mit der des CaSR korreliert. Um einen weiteren Zusammenhang zwischen diesen beiden Molekülen zu erhalten, sollte die genregulatorische Funktion von Calcitriol gehemmt werden. Eine Möglichkeit hierfür stellen Urämietoxine dar. Nach Bindung von Calcitriol an den Vitamin-D-Rezeptor können Urämietoxine verhindern, dass der Rezeptor in den Zellkern transportiert wird und hier an die VDREs (*Vitamin D Response Elements*) seiner Zielgene gelangt (Patel et al., 1994; Patel et al., 1995). Des Weiteren bieten sich Vitamin D-Analoga an, die als Antagonisten des Vitamin-D-Rezeptors wirken (Sakamaki et al., 2010).

Mit Hilfe der Untersuchungen dieser Arbeit konnten bereits einige Signalmoleküle aufgedeckt werden, die durch Calcium beeinflusst werden und so die Knochen-spezifische Metastasierung fördern, es sollten jedoch weitere regulatorische Faktoren analysiert werden. Hierbei sollten vor allem weitere Komponenten der bisher identifizierten Signalwege untersucht werden, um ihre Rolle in der Calcium-Signalweiterleitung bestätigen oder widerlegen zu können. Zudem müssten die Aktivitäten der im Phospho-Kinase-Array an zwei verschiedenen Zelllinien untersuchten Kinasen im Westernblot an einer größeren Anzahl von Zelllinien verifiziert werden.

Die Effekte von Calcium auf das zelluläre Verhalten wurden in dieser Arbeit mit Hinsicht auf Migration, Adhäsion und Proliferation untersucht. Eine verminderte Apoptose kann ebenfalls

zur Tumorprogression beitragen. Aus diesem Grund sollte auch ein möglicher Einfluss von Calcium auf die Apoptoserate der Zellen analysiert werden. Die Untersuchung des adhäsiven Verhaltens der Zellen an Komponenten der Extrazellularmatrix könnte um den Aspekt der Zell-Zell-Adhäsion erweitert werden. Hierbei wäre es von großem Interesse, welchen Einfluss Calcium auf die Adhäsion von NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial an Endothelzellen nimmt. Um Unterschiede in der gewebespezifischen Adhäsion besser aufdecken zu können, wäre es sinnvoll Endothelzellen aus Blutgefäßen der metastasierten Organe zu verwenden, in diesem Fall aus Lungen und Knochen. Eine von Calcium unabhängige Adhäsion der NZK-Zellen könnte ebenfalls weitere Hinweise auf ihr unterschiedliches Metastasierungsverhalten geben.

Mit Hilfe eines CaSR-Inhibitors konnte in der vorliegenden Arbeit die Rolle von Calcium in der Knochenmetastasierung und die Signalweiterleitung via CaSR bestätigt werden. Durch Ausschalten des Rezeptors konnte die Wirkung von Calcium auf die Zellen aufgehoben werden. Es wäre nun ratsam einen Aktivator des CaSR einzusetzen, um beurteilen zu können, ob dieser einen umgekehrten Effekt hervorruft. Hierbei würde sich das in der Forschung und Klinik eingesetzte Cinacalcet eignen. Zusätzlich zur Blockierung bzw. Aktivierung des CaSR sollte dieser mittels Transfektion in den NZK-Zellen überexprimiert bzw. mittels shRNA ausgeschaltet werden. Diese Untersuchungen würden ein exakteres Ergebnis liefern, da bei einer Behandlung von Zellen mit bestimmten Substanzen – auch wenn diese selektiv an den CaSR binden – nie gewisse Nebeneffekte ausgeschlossen werden können.

Durch die Verwendung des CaSR-Inhibitors konnte zudem bekräftigt werden, dass Calcium über den CaSR auf das zelluläre Verhalten Einfluss nimmt. Eine zusätzliche Wirkung über alternative, CaSR-unabhängige Signalmediatoren und -wege konnte jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund sollte das Vorhandensein von mGlu- und GABA_B-Rezeptoren auf NZK-Zellen und eine Sekretion von S100-Proteinen überprüft werden. Ein wichtiger Aspekt ist zudem ein möglicher Einstrom von Calcium aus dem Extrazellularraum durch TRP-Kanäle in das Zytosol der Zelle. Intrazellulär kann Calcium ebenfalls das zelluläre Verhalten beeinflussen. Somit müsste untersucht werden, ob die in der vorliegenden Arbeit untersuchten NZK-Zellen TRP-Kanäle exprimieren und eine Calcium-Behandlung eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration auslöst.

Schließlich müsste eine Untersuchung der hier aufgedeckten Mechanismen der Knochenmetastasierung des NZK am Mausmodell durchgeführt werden. Im abgeschlossenen System der Zellkultur können Zellen nur mit den gegebenen Faktoren kommunizieren und finden die auf sie abgestimmten Bedingungen vor. Die Forschung am Mausmodell bietet die Möglichkeit die auftretenden Ereignisse im gesamten Organismus betrachten zu können. Es würde sich anbieten, metastasierende NZK-Zellen mit unterschiedlicher CaSR-Expression in die Schwanzvene von Mäusen zu injizieren und ihre Verteilung im Blutkreislauf und mögliche Metastasierung in spezifische Organe zu beobachten. Zusätzlich könnte die Ausbreitung von in Knochen metastasierenden NZK-Zellen analysiert werden, in denen die CaSR-Expression zuvor durch shRNA ausgeschaltet wurde bzw. von nicht-metastasierenden NZK-Zellen, in denen der CaSR überexprimiert wurde. Auf diese Weise könnte der Einfluss des CaSR auf das knochenspezifische Metastasierungsverhalten von NZK-Zellen *in vivo* beurteilt werden.

Die hier aufgeführten Analysen würden die bisher bestehenden Kenntnisse bezüglich der Bedeutung von Calcium und des CaSR in der Knochenmetastasierung des NZK vertiefen und die beteiligten Signalwege möglicherweise weiter spezifizieren. Dies könnte einen weiteren Schritt in Richtung individualisierter Therapie bedeuten.

5.1 Zusammenfassung

Der Grund für die schlechte Prognose des Nierenzellkarzinoms (NZK) ist nicht der Primärtumor, sondern die häufige Ausbildung von Fernmetastasen. Obwohl bereits vieles über die Mechanismen der Metastasierung bekannt ist, sind die Hintergründe der Organspezifität metastasierender Tumorzellen weitgehend ungeklärt. In 30% der Fälle kommt es zur Entstehung von Knochenmetastasen. Diese hohe Frequenz deutet darauf hin, dass NZK-Zellen bevorzugt in dieses Organ metastasieren, da die Knochenmatrix ein günstiges Mikromilieu für ihr Wachstum bietet. Hierbei könnte extrazellulärem Calcium und dem für die Detektion zuständigen Calcium-sensitiven Rezeptor (CaSR) eine entscheidende Rolle zukommen, da sich Knochen durch ihren hohen Gehalt an Calcium auszeichnen und darin von anderen Organen unterscheiden. Das Ziel der vorliegenden Dissertation lag in der Aufklärung der Mechanismen, die zu einer Knochenmetastasierung des NZK führen.

In ersten Analysen konnte gezeigt werden, dass sich bereits der Primärtumor durch eine von Calcium unabhängige charakteristische Expression bestimmter Signalmediatoren auszeichnet, die Metastasierungspotenzial und –ort bestimmen. So wurden in Gewebeproben und primären Tumorzellen von NZK-Patienten, die innerhalb von fünf Jahren nach Nephrektomie Knochenmetastasen entwickelten, in Westernblot-Analysen eine sehr hohe Expression der α5-Integrine, eine starke Aktivität von Akt, FAK und eine Reduktion der PTEN-Expression detektiert. Diese Veränderungen begünstigten die chemotaktische Migration in Richtung Fibronektin (bestimmt in einer Boyden-Kammer) und die Adhäsion dieser NZK-Zellen an Komponenten der Extrazellularmatrix (Fibronektin und Kollagen I – beide sind Bestandteile der Knochenmatrix). Migration und Adhäsion sind essentielle Schritte beim Austreten der Tumorzellen aus dem Primärtumor und Infiltration in den Knochen. In NZK-Zellen von Patienten, die keine Metastasen oder Lungenmetastasen entwickelten, waren diese Charakteristika nicht oder deutlich schwächer ausgeprägt. Bestimmte Primärtumoren sind somit prädestiniert Knochenmetastasen auszubilden.

Um die Bedeutung von extrazellulärem Calcium und dem CaSR darzustellen, wurde die Expression des CaSR mittels Real-Time PCR, Westernblot-Analysen und durchflusszytometrisch in NZK-Gewebeproben und –Zellen von Patienten untersucht, die innerhalb von fünf Jahren nach Nephrektomie keine bzw. Lungen- oder Knochenmetastasen ausbildeten. Proben von Patienten mit Knochenmetastasen zeigten die stärkste Expression von *CaSR*-mRNA und CaSR-Protein. Durch eine Behandlung der NZK-Zellen mit Calcium in physiologischen Konzentrationen konnte Calcium als möglicher Regulator der CaSR-Expression ausgeschlossen werden. Der Einfluss von Calcium auf die Metastasierungsfähigkeit der primären NZK-Zellen wurde anhand eines weiteren chemotaktischen Migrationsversuchs mit Calcium als Chemotaxin analysiert. Die Zellproliferationsrate konnte nach Behandlung der Zellen mit Calcium mittels BrdU-Inkorporation gemessen werden. NZK-Zellen, die aus dem Primärtumor von Patienten mit Knochenmetastasen kultiviert wurden, konnten durch eine erhöhte extrazelluläre Calcium-Konzentration verstärkt zu Migration und Proliferation (Konzentrations-abhängige Steigerung) angeregt werden. Diese stellen weitere essentielle Schritte bei der Infiltration und Vermehrung der NZK-Zellen in den Knochen dar. Die Effekte traten bei NZK-Zellen aus Patienten, die keine oder Lungenmetastasen ausbildeten, nicht auf. Die Identifizierung der beteiligten Signalwege erfolgte in Westernblot-Analysen und einem Phospho-Kinase Array. Hierdurch konnten eine verstärkte Aktivierung des Akt-, JNK-, p38a- und PLCy-1-Signalwegs und eine beinahe vollständige Reduktion der PTEN-Expression nach Calcium-Behandlung in Knochen-metastasierenden NZK-Zellen aufgedeckt werden. Durch Blockierung des CaSR mittels des Inhibitors NPS 2143 konnte bestätigt werden, dass die metastasierungs-fördernde Wirkung von Calcium über den CaSR zustande kommt.

NZK-Zellen zeichnen sich somit bereits im Primärtumor durch eine charakteristische Expression verschiedener Signalmediatoren aus, die ihr Metastasierungspotenzial und die mögliche Lokalisation der Metastase bestimmen. Gelangen metastasierende NZK-Zellen auf ihrem Weg durch den Blutkreislauf in das Knochenmilieu, verhilft ihnen hier eine hohe Expression des CaSR zu einem wichtigen Überlebensvorteil. Extrazelluläres Calcium wirkt über den CaSR, verstärkt ihre metastatischen Eigenschaften und fördert schließlich die Ausbildung einer Knochenmetastase. Aus diesem Grund kommt dem CaSR eine Rolle als möglicher prognostischer Marker hinsichtlich der Knochenmetastasierung beim NZK zu. Die Charakteristika des Primärtumors sollten daher die Auswahl des adjuvanten Therapeutikums und die Nachsorgeuntersuchungen beeinflussen. um die Medizin dem Ziel einer individualisierten Therapie näher zu bringen.

5.2 Summary

Metastatic spread rather than the primary tumor is responsible for the poor prognosis of renal cell carcinomas (RCC). Although the mechanisms of metastasis are well known the organselective nature of tumor cells is poorly understood. Approximately 30% of RCC patients develop bone metastases during the course of disease. This high frequency indicates a renal tumor cell favorable environment in the bone matrix encouraging metastasis. Characteristic for bone tissue is a unique high concentration of calcium ions. This in combination with the calcium-sensing receptor (CaSR) could play a decisive role in the promotion of bone metastasis. The purpose of this thesis is to reveal the mechanisms which support RCC bone metastasis.

The initial investigation concerns the signal molecule expression patterns and metastatic behavior of tissue specimens and primary tumor cells collected from RCC patients with differing metastasic sites. Western blot analysis showed characteristic expression patterns which are already existent in the primary tumor and independent of extracellular calcium. This was accompanied by a specific cellular behavior which may or may not promote metastasis in a specific site. RCC tissue specimens and cells from patients, who developed bone metastases within five years after nephrectomy, exhibited a high expression of integrin α 5, reduction of PTEN expression and intensified activity of Akt and FAK. These alterations facilitated cell migration (analysed chemotactically in a Boyden chamber) in towards fibronectin and adhesion to components of the bone extracellular matrix (fibronectin and collagen type I which are both contained in the bone matrix). Migration and adhesion are essential steps during the escape of RCC cells from patients with no metastases or those who developed lung metastases within five years after nephrectomy. Thus, certain primary tumors are predestined to form bone metastases.

To clarify the role of extracellular calcium and CaSR, the expression of CaSR was measured by real-time PCR, Western blot analysis and flow cytometry in RCC tissue specimens and primary cells from patients with no metastases, or those who developed lung or bone metastases within five years after nephrectomy. Specimens from patients developing bone metastases showed the highest expression of *CaSR* mRNA and CaSR protein compared to patients without metastases or with lung metastases. Treatment of RCC cells with calcium in physiological concentrations had no influence on the expression of CaSR, therefore it can be excluded as a regulator for the expression of CaSR. The impact of calcium on the ability of RCC cells to metastasize was analyzed chemotactically in a Boyden cell migration assay with calcium as a chemotaxin. Cell proliferation was measured by BrdU incorporation after treatment of the cells with calcium. Elevated extracellular calcium promoted migration and proliferation of RCC cells from patients with bone metastases in a concentration dependent manner, but not of cells from patients who had no metastases or who had developed lung metastases. These are further essential steps during infiltration of the bone matrix and formation of metastases. The contributing signal transduction molecules were investigated by further Western blot analyses and a phospho-kinase array. Calcium treatment induced an increase in the activity of Akt, JNK, p38 α and PLC γ -1 and an almost complete decline in the expression of PTEN in RCC cells from patients who developed bone metastases. The importance of the CaSR in formation of bone metastases was verified by its selective blocking using the CaSR inhibitor NPS 2143.

RCC cells from patients with bone metastases are characterized by a specific expression pattern of various signaling mediators, which define their metastatic potential and location. In disseminated CaSR expressing RCC cells which reach the calcium enriched bone environment through blood circulation, these metastatic abilities are further enhanced by calcium and finally cause the formation of bone metastases. Therefore CaSR may be regarded as a new prognostic marker predicting RCC bone metastasis. The selection of adjuvant therapeutics and follow-up examinations should be adapted to the characteristics of the primary tumor to achieve an individualized therapy.

6. Literaturverzeichnis

Abukawa H., Mano H., Arakawa T., Hakeda Y., Kimura H., Kumegawa M. (2001) *Tissue* specific expression and differential regulation by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 of the calcium-sensing receptor (CaSR) gene in rat kidney, intestine, and calvaria. Cytotechnology 35(1): 81-6.

Adams G.B., Chabner K.T., Alley I.R., Olson D.P., Szczepiorkowski Z.M., Poznansky M.C., Kos C.H., Pollak M.R., Brown E.M., Scadden D.T. (2006) *Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor*. Nature 439(7076): 599-603

Arbodela J., Lysons J.F., Kabbinavar F.F., Bray M.R., Snow B.E., Ayala R., Danino M., Karlan B.Y., Slamon D.J. (2003) Overexpression of AKT2/protein kinase $B\beta$ leads to upregulation of βl integrins, increased invasion and metastasis of human breast and ovarian cancer cell. Cancer Research 63: 196-206

Arey B.J., Seethala R., Ma Z., Fura A., Morin J., Swartz J., Vyas V., Yang W., Dickson J.K. Jr, Feyen J.H. (2005) *A novel calcium-sensing receptor antagonist transiently stimulates parathyroid hormone secretion in vivo*. Endocrinology 146(4): 2015-22

Arjumand W., Sultana S. (2012) *Role of VHL gene mutation in human renal cell carcinoma*. Tumour Biol. 33(1): 9-16

Assouad J., Petkova B., Berna P., Dujon A., Foucault C., Riquet M. (2007) *Renal cell carcinoma lung metastases surgery: pathologic findings and prognostic factors.* Ann Thorac Surg 84(4): 1114-20

Ba J., Brown D., Friedman P.A. (2003) *Calcium-sensing receptor regulation of PTH-inhibitable proximal tubule phosphate transport*. Am J Physiol Renal Physiol 285(6): F1233-43

Banumathy G., Cairns P. (2010) *Signaling pathways in renal cell carcinoma*. Cancer Biology & Therapy 10:7, 658-664

Barczyk M., Carracedo S., Gullberg D. (2010) Integrins. Cell Tissue Res 339(1): 269-80

Bashyam M.D. (2002) Understanding cancer metastasis. Cancer 94(6) 1821-29

Beierwaltes W.H. (2010) *The role of calcium in the regulation of renin secretion*. Am J Physiol Renal Physiol 298(1): F1-F11

Bellacosa A., Testa J.R., Moore R., Larue L. (2004) *A portrait of AKT kinases: human cancer and animal models depict a family with strong individualities.* Cancer Biol Ther. 3(3):268-75

Bhagavathula N., Kelley E.A., Reddy M., Nerusu K.C., Leonard C., Fay K., Chakrabarty S., Varani J. (2005) Upregulation of calcium-sensing receptor and mitogen-activated protein kinase signalling in the regulation of growth and differentiation in colon carcinoma. Br J Cancer 93(12): 1364-71

Bleumer I., Oosterwijk E., de Mulder P., Mulders P.F. (2003) *Immunotherapy for renal cell carcinoma*. Euro Urol. 44(1):65-75

Blomberg J.M., Andersen C.B., Nielsen J.E., Bagi P., Jørgensen A., Juul A., Leffers H. (2010) *Expression of the vitamin D receptor*, 25-hydroxylases, 1alpha-hydroxylase and 24-hydroxylase in the human kidney and renal clear cell cancer. J Steroid Biochem Mol Biol. 121(1-2): 376-82

Boye K., Maelandsmo G.M. (2010) S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles. Am J Pathol 176(2): 528-35

Bradham C., McClay D.R. (2006) *p38 MAPK in development and cancer*. Cell Cycle 5(8): 824-8

Brakebusch C., Fässler R. (2005) $\beta 1$ integrin function in vivo: adhesion, migration and more. Cancer and Metastasis Reviews 24: 403-11

Brancho D., Tanaka N., Jaeschke A., Ventura J.J., Kelkar N., Tanaka Y., Kyuuma M., Takeshita T., Flavell R.A., Davis R.J. (2003) *Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo*. Genes Dev 17(16): 1969-78

Brennan S.C., Connigrave A.D. (2009) Regulation of cellular signal transduction pathways by the extracellular calcium-sensing receptor. Curr Pharm Biotechnol 10(3): 270-81

Brenner W., Beitz S., Schneider E., Benzing F., Unger R.E., Roos F.C., Thüroff J.W., Hampel C. (2010) *Adhesion of renal carcinoma cells to endothelial cells depends on PKCµ*. BMC Cancer 10: 183

Brenner W., Färber G., Herget T., Lehr H.-A., Hengstler J.G., Thüroff J.W. (2002) Loss of tumor suppressor protein PTEN during renal carcinogenesis. Int. J. Cancer 99: 53-57

Brenner W., Greber I., Gudejko-Thiel J., Beitz S., Schneider E., Walenta S., Peters K., Unger R., Thüroff J.W. (2008) *Migration of renal carcinoma cells is dependent on protein kinase Cdelta via betal integrin and focal adhesion kinase*. Int J Oncol 32(5): 1125-31

Brown A.J., Zhong M., Finch J., Ritter C., McCracken R., Morrissey J., Slatopolsky E. (1996) *Rat calcium-sensing receptor is regulated by vitamin D but not by calcium*. AJP - Renal Physiol Vol. 270 No. 3 F454-F460

Brown E.M., Gamba G., Riccardi D., Lombardi M., Butters R., Kifor O., Sun A., Hediger M.A., Lytton J., Hebert S.C. (1993) *Cloning and characterization of an extracellular Ca*(2+)-*sensing receptor from bovine parathyroid.* Nature 366(6455): 575-80

Brown E.M., MacLeod R.J. (2001) *Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling*. Physiol Rev Vol. 81, No. 1

Brune M., Müller M., Melino G., Bierhaus A., Schilling T., Nawroth P.P. (2012) Depletion of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) sensitizes towards apoptosis via p53 and p73 posttranslational regulation. Oncogene 30. doi: 10.1038/onc.2012.150 (Epub ahead of print)

Buentig N., Störkel S., Atzpodien J. (2002) Molekulargenetische Veränderungen in Nierenzellkarzinomen. Urologe 41: 475-81

Burtis W.J., Wu T., Bunch C., Wysolmerski J.J., Insogna K.L., Weir E.C., Broadus A.E., Stewart A.F. (1987) *Identification of a Novel 17,000-Dalton Parathyroid Hormone-like* Adenylate Cyclase-stimulating Protein from a Tumor Associated with Humoral Hypercalcemia of Malignancy. The Journal of Biological Chemistry 262(15): 7151-7156

Cabanillas M.E., Waguespack S.G., Bronstein Y., Williams M.D., Feng L., Hernandez M., Lopez A., Sherman S.I., Busaidy N.L. (2010) *Treatment with tyrosine kinase inhibitors for patients with differentiated thyroid cancer: the M. D. Anderson experience.* J Clin Endocrinol Metab 95(6): 2588-95

Cairns P. (2012) Renal cell carcinoma. Cancer Biomark 9(1-6): 461-473

Canaff L., Hendy G.N. (2002) Human Calcium-sensing Receptor Gene. Vitamin D response elements in promoters P1 and P2 confer transcriptional responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D. J Biol Chem 277(33): 30337-30350

Chambers A.F., Groom A.C., MacDonald I.C. (2002) *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. Nature Reviews Cancer 2: 563-72

Chattopadhyay N., Ye C.P., Yamaguchi T., Kerner R., Vassilev P.M., Brown E.M. (1999) *Extracellular calcium-sensing receptor induces cellular proliferation and activation of a nonselective cation channel in U373 human astrocytoma cells.* Brain Res 851(1-2): 116-24

Chen J.S., Huang X.H., Wang Q., Chen X.L., Fu X.H., Tan H.X., Zhang L.J., Li W., Bi J. (2010) *FAK is involved in invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma*. Clin Exp Metastasis 27(2): 71-82

Chiang A.C., Massagué J. (2008) Molecular basis of metastasis. N Engl J Med 359(26): 2814-23

Ching Y.P., Leong V.Y., Lee M.F., Xu H.T., Jin D.Y., Ng I.O. (2007) P21-activated protein kinase is overexpressed in hepatocellular carcinoma and enhances cancer metastasis involving c-Jun NH2-terminal kinase activation and paxillin phosphorylation. Cancer Res 67(8): 3601-8

Chow J.Y., Cabral J.A., Chang J., Carethers J.M. *TGFbeta modulates PTEN expression independently of SMAD signaling for growth proliferation in colon cancer cells*. Cancer Biol Ther 7(10): 1694-9

Clifford S.C., Prowse A.H., Affara N.A., Buys C.H., Maher E.R. (1998) Inactivation of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor gene and allelic losses at chromosome arm 3p in primary renal cell carcinoma: evidence for a VHL-independent pathway in clear cell renal tumourigenesis. Genes Chromosomes Cancer 22(3): 200-9

Cohen H.T., McGovern F.J. (2005) Renal-Cell Carcinoma. N Engl J Med 353: 2477-2490

Cooper C.R., Pienta K.J. (2000) *Cell adhesion and chemotaxis in prostate cancer metastasis to bone: a minireview.* Prostate Cancer Prostatic Dis 3(1): 6-12

Cully M., You H., Levine A.J., Mak T.W. (2006) *Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway* as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. Nature 6: 184-92

Deacon K., Mistry P., Chernoff J., Blank J.L., Patel R. (2003) *p38 Mitogen-activated protein* kinase mediates cell death and *p21-activated kinase mediates cell survival during* chemotherapeutic drug-induced mitotic arrest. Mol Biol Cell 14: 2071-87

Donato M. (2007) *RAGE: a single receptor for several ligands and different cellular responses: the case of certain S100 proteins.* Curr Mol Med 7(8): 711-24

Drücke T. (2004) Modulation and action of the calcium-sensing receptor. Nephrol Dial Transplant 19(5): 20-26

Dusso A.S., Brown A.J., Slatopolsky E. (2005) Vitamin D. Am J Physiol Renal Physiol 289: F8-F28

Enomoto A., Murakami H., Asai N., Morone N., Watanabe T., Kawai K., Murakumo Y., Usukura J., Kaibuchi K., Takahashi M. (2005) *Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE*. Dev Cell 9: 389-402

Fata J.E., Debnath S., Jenkins E.C. Jr, Fournier M.V. (2012) Nongenomic Mechanisms of PTEN Regulation. Int J Cell Biol 2012:379685

Fidler I.J. (2001) Seed and soil revisited: contribution of the organ microenvironment to cancer metastasis. Surg Oncol Clin N Am. 10(2): 257-69

Finley D.S., Pantuck A.J., Belldegrun A.S. (2011) *Tumor Biology and Prognostic Factors in Renal Cell Carcinoma*. The Oncologist 16(suppl 2): 4–13

Flanigan R.C., Campbell S.C., Clark J.I., Picken M.M. (2003) *Metastatic renal cell carcinoma*. Curr Treat Options Oncol. 4(5): 385-90

Flier A., Sonnenberg A. (2001) Function and interactions of integrins. Cell tissue Res 305: 285-98

Fornara P., Hoda M.R. (2011) *Das Nierenzellkarzinom*. Der Urologe A, Volume 50, Supplement 1 219-222

Fottner A., Szalantzy M., Wirthmann L., Stähler M., Baur-Melnyk A., Jansson V., Dürr H.R. (2010) *Bone metastases from renal cell carcinoma: patient survival after surgical treatment*. BMC Musculoskeletal Disorders 11: 145

Frantz C., Stewart K.M., Weaver V.M. (2010) *The extracellular matrix at a glance*. J Cell Sci 123(Pt 24): 4195-200

Frees S.K. (2008) *Die RNA-Expression des Tumorsuppressorgens PTEN im Nierenzellkarzinom.* Dissertation im Fachbereich Medizin der Universitätsmedizin Mainz

Geng Y., Marshall J.R., King M.R. (2012) *Glycomechanics of the metastatic cascade: tumor cell-endothelial cell interactions in the circulation*. Ann Biomed Eng 40(4): 790-805

Giard D.J., Aaronson S.A., Todaro G.J., Arnstein P., Kersey J.H., Dosik H., Parks W.P. (1973) *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors.* J Natl Cancer Inst 51(5): 1417-23

Girgin C., Tarhan H., Hekimgil M., Sezer A., Gürel G. (2001) *p53 mutations and other prognostic factors of renal cell carcinoma*. Urol Int 66(2): 78-83

Globus R.K., Doty S.B., Lull J.C., Holmuhamedov E., Humphries M.J., Damsky C.H. (1998) *Fibronectin is a survival factor for differentiated osteoblasts*. J Cell Sci 111 (Pt 10): 1385-93

Gnarra J.R., Tory K., Weng Y., Schmidt L., Wei M.H., Li H., Latif F., Liu S., Chen F., Duh F.M. (1994) *Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma*. Nat Genet. 7(1): 85-90

Godwin S.L., Soltoff S.P. (2002) Calcium-sensing receptor-mediated activation of phospholipase C-gammal is downstream of phospholipase C-beta and protein kinase C in *MC3T3-E1* osteoblasts. Bone 30(4): 559-66

Goel A., Arnold C.N., Niedzwiecki D., Carethers J.M., Dowell J.M., Wasserman L., Compton C., Mayer R.J., Bertagnolli M.M., Boland C.R. (2004) Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers. Cancer Res 64(9): 3014-21

Golubovskaya V.M., Conway-Dorsey K., Edmiston S.N., Tse C.K., Lark A.A., Livasy C.A., Moore D., Millikan R.C., Cance W.G. (2009) *FAK overexpression and p53 mutations are highly correlated in human breast cancer*. Int J Cancer 125(7): 1735-8

Gu J., Tamura M., Pankov R., Danen E.J.H., Takino T., Matsumoto K., Yamada K.M. (1999) *Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN*. The Journal of Cell Biology 146(2): 389-403

Guo J., Li H.Z., Zhang W.H., Wang L.C., Wang L.N., Zhang L., Li G.W., Li H.X., Yang B.F., Wu L., Wang R., Xu C.Q. (2010) *Increased expression of calcium-sensing receptors induced by ox-LDL amplifies apoptosis of cardiomyocytes during simulated ischaemia-reperfusion*. Clin Exp Pharmacol Physiol. 37(3): e128-35.

Haferkamp A., Rohde D., Müller S.C., Rübben H., Hohenfellner M. (2006) *Das Nierenzellkarzinom.* Der Urologe A, Volume 45, Supplement 4, 74-84

Hager M., Hahre H., Kemmerling R., Mikuz G., Kolbitsch C., Moser P.L. (2007) *PTEN* expression in renal cell carcinoma and oncocytoma and prognosis. Pathology 39(5): 482-85

Han K.R., Pantuck A.J., Bui M.T.B., Shvarts O., Freitas D.G., Zisman A., Leibovich B.C., Dorey F.J., Gitlitz B.J., Figlin R.A., Belldegrun A.S. (2003) *Number of metastastic sites rather than location dictates overall survival of patients with node-negative metastatic renal cell carcinoma*. Urology 61(2): 314-319

Hanahan D., Weinberg R.A. (2000) The hallmarks of cancer. Cell 100(1): 57-70

Hanahan D., Weinberg R.A. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell 144: 646-674

Hashimura T., Tubbs R.R., Connelly R., Caulfield M.J., Trindade C.S., McMahon J.T., Gaietti T.P., Edinger M., Sandberg A.A., Cin P.D., Sait S.J., Pontes J.E. (1989) *Characterization of Two Cell Lines with Distinct Phenotypes and Genotypes Established from a Patient with Renal Cell Carcinoma*. Cancer Res 49(15): 7064-7071

Heer P., Koudijs M.M., van de Velde C.J., Aalbers R.I., Tollenaar R.A., Putter H., Morreau J., van de Water B., Kuppen P.J. (2008) *Combined expression of the non-receptor protein tyrosine kinases FAK and Src in primary colorectal cancer is associated with tumor recurrence and metastasis formation*. Eur J Surg Oncol 34(11): 1253-61

Helfman D.M., Kim E.J., Lukanidin E., Grigorian M. (2005) *The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis.* British Journal of Cancer 92, 1955 – 1958

Hebert S.C., Brown E.M., Harris H.W. (1997) Role of the Ca(2+)-sensing receptor in divalent mineral ion homeostasis. J Exp Biol 200(Pt 2): 295-302

Hers I., Vincent E.E., Tavaré J.M. (2011) Akt signalling in health and disease. Cellular Signalling 23: 1515–1527

Hiani Y., Ahidouch A., Lehen'kyi V., Hague F., Gouilleux F., Mentaverri R., Kamel S., Lassoued K., Brûlé G., Ouadid-Ahidouch H. (2009) *Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 and TRPC1 channels are required for calcium-sensing receptor-stimulated MCF-7 breast cancer cell proliferation*. Cell Physiol Biochem 23(4-6): 335-46

Hiles J.J., Kolesar J.M. (2008) *Role of sunitivib and sorafenib in the treatment of metastatic renal cell carcinoma*. Am J Health Syst Pharm. 65(2):123-31

Hino R., Uozaki H., Murakami N., Ushiku T., Shinozaki A., Ishikawa S., Morikawa T., Nakaya T., Sakatani T., Takada K., Fukayama M. (2009) Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV latent membrane protein 2A leads to promoter hypermethylation of PTEN gene in gastric carcinoma. Cancer Res 69(7): 2766-74

Hobson S.A., McNeil S.E., Lee F., Rodland K.D. (2000) Signal transduction mechanisms linking increased extracellular calcium to proliferation in ovarian surface epithelial cells. Exp Cell Res 258: 1-11

Hsu Y., Hoenderop J.G.J., Bindels R.J.M. (2007) *TRP channels in kidney disease*. Biochimica et Biophysica Acta 1772: 928–936

Hu J., Spiegel A.M. (2007) Structure and function of the human calcium sensing receptor: insights from natural and engineered mutations and allosteric modulators. J Cell Mol Med 11(5): 908-22

Huang C., Miller R.T. (2007) *The calcium-sensing receptor and its interacting proteins*. J Cell Mol Med, 11(5): 923-934

Huang C., Rajfur Z., Borchers C., Schaller M.D., Jacobson K. (2003) JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration. Nature 424(6945): 219-23

Huang Z., Yan D.P., Ge B.X. (2008) JNK regulates cell migration through promotion of tyrosine phosphorylation of paxillin. Cell Signal 20(11): 2002-12

Hynes R.O. (2003) *Metastatic potential: generic predisposition of the primary tumor or rare, metastatic variants-or both?* Cell 113(7): 821-3

Ikuyama T., Hamasaki T., Inatomi H., Katoh T., Muratani T., Matsumoto T. (2002) *Association of vitamin D receptor gene polymorphism with renal cell carcinoma in Japanese*. Endocr J 49(4): 433-8

Jensen A.A., Bräuner-Osborne H. (2007) Allosteric Modulation of the Calcium-Sensing Receptor. Current Neuropharmacology 5: 180-186

Jones J., Libermann T.A. (2007) *Genomics of renal cell cancer: the biology behind and the therapy ahead.* Clin Cancer Res 13(2 Pt 2): 685s-692s

Jung S.T., Ghert M.A., Harrelson J.M., Scully S.P. (2003) *Treatment of osseous metastases in patients with renal cell carcinoma*. Clin Orthop Relat Res 409: 223-31

Kaplan R.N., RibaR.D., Zacharoulis S., BramleyA.H., Vincent L., CostaC., MacDonaldD.D., Jin D.K., Shido K., Kerns S.A., Zhu Z., Hicklin D., Wu Y., Port J.L., Altorki N., Port E.R., Ruggero D., Shmelkov S.V., Jensen K.K., Rafii S., Lyden D. (2005) *VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche*. Nature 438, 820-27

Kaplan R.N., Rafii S., Lyden D. (2006) *Preparing the "Soil": The Premetastatic Niche*. Cancer Res 66:11089-11093

Keller E.T., Zhang J., Cooper C.R., Smith P.C., McCauley L.K., Pienta K.J., Taichman R.S. (2001) *Prostate carcinoma skeletal metastases: Cross-talk between tumor and bone*. Cancer and Metastasis Rev 20: 333-349

Khageh-Hosseini S. (2010) Molekulare Evaluation der Sensitivität und Resistenz von therapeutischen Kinaseinhibitoren im Nierenzellkarzinom. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg Universität Mainz

Kim F.J., Campagna A., Khandrika L., Koul S., Byun S.S., van Bokhoven A., Moore E.E., Koul H. (2008) *Individualized medicine for renal cell carcinoma: establishment of primary cell line culture from surgical specimens.* J Endourol 22(10):2361-6

Kim R.H., Mak T.W. (2006) *Tumours and tremors: how PTEN regulation underlies both*. British Journal of Cancer 94: 620-24

Kölsch V., Charest P.G., Firtel R.A. (2008) *The regulation of cell motility and chemotaxis by phospholipid signaling*. J Cell Sci 121(Pt 5): 551-9

Kominsky S.L., Doucet M., Brady K., Weber K.L. (2007) *TGF-\beta promotes the establishment of renal cell carcinoma bone metastasis.* J Bone Miner Res 22(1): 37-44

Korhonen M., Laitinen L., Ylänne J., Koukoulis G.K., Quaranta V., Juusela H., Gould V.E., Virtanen I. (1992) *Integrin distributions in renal cell carcinomas of various grades of malignancy*. Am J Pathol. 141(5): 1161–71

Krauss G. (2003) *Biochemistry of signal transduction and regulation*. Kapitel 9, 11. Wiley-VCH, 3. Auflage

Kruck S., Bedke J., Hennenlotter J., Ohneseit P.A., Kuehs U., Senger E., Sievert K.D., Stenzl A. (2010) Activation of mTOR in renal cell carcinoma is due to increased phosphorylation rather than protein overexpression. Oncol Rep 23(1): 159-63

Kubes P., Kerfoot S.M. (2001) Leukocyte recruitment in the microcirculation: the rolling paradigm revisited. News Physiol Sci 16: 76-80

Kubo Y., Miyashita T., Murata Y. (1998) Structural Basis for a Ca21-Sensing Function of the Metabotropic Glutamate Receptors. Science 279, 1722-1725

Kwak J.O., Kwak J., Kim H.W., Oh K.J., Kim Y.T., Jung S.M., Cha S.H. (2005) *The extracellular calcium sensing receptor is expressed in mouse mesangial cells and modulates cell proliferation*. Exp Mol Med 37(5): 457-465

Lam B.S., Cunningham C., Adams G.B. (2011) *Pharmacologic modulation of the calcium*sensing receptor enhances hematopoietic stem cell lodgment in the adult bone marrow. Blood 117(4): 1167-75

Lam C.W., Lee K.F., Chan A.O., Poon P.M., Law T.Y., Tong S.F. (2005) Novel missense mutation in the CASR gene in a Chinese family with familial hypocalciuric hypercalcemia. Clin Chim Acta 360(1-2): 167-72

Li G.W., Xing W.J., Bai S.Z., Hao J.H., Guo J., Li H.Z., Li H.X., Zhang W.H., Yang B.F., Wu L.Y., Wang R., Yang G.D., Xu C.Q. (2011) *The calcium-sensing receptor mediates hypoxia-induced proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells through MEK1/ERK1,2 and PI3K pathways.* Basic Clin Pharmacol Toxicol 108(3): 185-93

Li H.X., Kong F.J., Bai S.Z., He W., Xing W.J., Xi Y.H., Li G.W., Guo J., Li H.Z., Wu L.Y., Wang R., Yang G.D., Tian Y., Xu C.Q. (2012) *Involvement of calcium-sensing receptor in oxLDL-induced MMP-2 production in vascular smooth muscle cells via PI3K/Akt pathway.* Mol Cell Biochem. 362(1-2): 115-22

Li J., Yen C., Liaw D., Podsypanina K., Bose S., Wang S.I., Puc J., Miliaresis C., Rodgers L., McCombie R., Bigner S.H., Giovanella B.C., Ittmann M., Tycko B., Hibshoosh H., Wigler M.H., Parsons R. (1997) *PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer*. Science 275(5308): 1943-7

Liang H., Gu M., Yang C., Wang H., Wen X., Zhou Q. (2012) Sevoflurane inhibits invasion and migration of lung cancer cells by inactivating the p38 MAPK signaling pathway. J Anesth 26(3): 381-92

Liao J., Schneider A., Datta N.S., McCauley L.K. (2006) *Extracellular calcium as a candidate mediator of prostate cancer skeletal metastasis*. Cancer Res 66(18): 9065-9073

Linehan W.M., Zbar B. (2004) Focus on kidney cancer. Cancer Cell 6: 223-28

Liu G., Hu X., Chakrabarty S. (2010) Vitamin D mediates its action in human colon carcinoma cells in a calcium-sensing receptor-dependent manner: downregulates malignant cell behavior and the expression of thymidylate synthase and survivin and promotes cellular sensitivity to 5-FU. Int J Cancer 126(3): 631-9

Ljungberg B., Campbell S.C., Choi H.Y., Jacqmin D., Lee J.E., Weikert S., Kiemeney L.A. (2011) *The epidemiology of renal cell carcinoma*. Eur Urol 60(4): 615-21

Lorenzo G., Autorino R., Sternberg C.N. (2009) *Metastatic Renal Cell Carcinoma: Recent Advances in the Targeted Therapy Era*. European Urology 56: 959–971

Maehama T., Dixon J.E. (1998) The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. J Biol Chem 273(22): 13375-13378

Manning A.T., O'Brien N., Kerin M.J. (2006) Roles for the calcium sensing receptor in primary and metastatic cancer. EJSO 32: 693-697

Mareel M., Leroy A. (2003) Clinical, cellular and molecular aspects of cancer invasion. Physiol. Rev. 83: 337-76

Maucher D. (2012) Molekulare Wirkmechanismen der Tyrosinkinase-Inhibition durch Pazopanib beim Nierenzellkarzinom. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg Universität Mainz

Mc Cawley L.J, Matrisian L.M. (2000) *Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression*. Mol Med Today 6(4):149-56

McCauley L., Martin T.J. (2012) Twenty-Five Years of PTHrP Progress: From Cancer Hormone to Multifunctional Cytokine. Journal of Bone and Mineral Research 27(6): 1231–1239

Meng F., Henson R., Wehbe-Janek H., Ghoshal K., Jacob S.T., Patel T. (2007) *MicroRNA-21* regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. Gastroenterology 133(2): 647-58

Meng X.N., Jin Y., Yu Y., Bai J., Liu G.Y., Zhu J., Zhao Y.Z., Wang Z., Chen F., Lee K.Y., Fu S.B. (2009) *Characterisation of fibronectin-mediated FAK signalling pathways in lung cancer cell migration and invasion*. Br J Cancer 101(2): 327-34

Merseburger A.S., Kuczyk M.A. (2008) Der Stellenwert der Target-Therapie beim Nierenzellkarzinom. Urologe 47: 1303-1310

Mihai R. (2008) The calcium sensing receptor: from understanding parathyroid calcium homeostasis to bone metastases. Ann R Coll Surg Engl 90: 271–277

Mihai R., Stevens J., McKinney C., Ibrahim N.B.N. (2006) *Expression of the calcium* receptor in human breast cancer – a potential new marker predicting the risk of bone metastases. EJSO 32: 511-515

Miki H., Takenawa T. (2003) Regulation of actin dynamics by WASP family proteins. J Biochem. 134(3):309-13

Miles F.L., Pruitt F.L., van Golen K.L., Cooper C.R. (2008) *Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis.* Clin Exp Metastasis 25(4): 305-24

Miller K. (2010) Erstlinientherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms (mRCC) – Update 2009. Onkologie 33 (suppl 1): 5-9

Miyazaki T., Kato H., Nakajima M., Sohda M., Fukai Y., Masuda N., Manda R., Fukuchi M., Tsukada K., Kuwano H. (2003) *FAK overexpression is correlated with tumour invasiveness and lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma*. Br J Cancer 89(1): 140-5

Morgan-Parkes J.H. (1995) Metastases: mechanism, pathways and cascades. AJR 164: 1075-82

Muijen G.N., Danen E.H., Vries T.J., Quax P.H., Verheijen J.H., Ruiter D.J. (1995) *Properties of metastasizing and nonmetastasizing human melanoma cells.* Recent Results Cancer Res 139: 105-22

Mundy G.R. (1997) Mechanisms of bone metastasis. Cancer Supplement 80(8): 1546-1556

Nemeth E.F. (2002) *The search for calcium receptor antagonists (calcilytics)*. Journal of Molecular Endocrinology 29: 15–21

Nemeth E.F., Delmar E.G., Heaton W.L., Miller M.A., Lambert L.D., Conklin R.L., Gowen M., Gleason J.G., Bhatnagar P.K., Fox J. (2001) *Calcilytic compounds: potent and selective Ca2+ receptor antagonists that stimulate secretion of parathyroid hormone.* J Pharmacol Exp Ther 299(1): 323-31

Netter (2008) Atlas der Anatomie. Elsevier 4. Auflage

Neumann E., Engelsberg A., Decker J., Störkel S., Jaeger E., Huber C., Seliger B. (1998) *Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens RAGE-1, PRAME, and glycoprotein 75 in human renal cell carcinoma: candidates for T-cell-based immunotherapies?* Cancer Res. 58(18): 4090-5

Nguyen D.X., Bos P.D., Massagué J. (2009) *Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization*. Nat Rev Cancer 9(4): 274-84

Nordahl J., Mengarelli-Widholm S., Hultenby K., Reinholt F.P. (1995) Ultrastructural immunolocalization of fibronectin in epiphyseal and metaphyseal bone of young rats. Calcif Tissue Int 7(6): 442-9

Oberneder R., Kriegmair M., Staehler M., Hofstetter A. (1997) Immuntherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms. Urologe 36: 130-37

Ogata S., Kubota Y., Satoh S., Ito S., Takeuchi H., Ashizuka M., Shirasuna K. (2006) *Ca2+ stimulates COX-2 expression through calcium-sensing receptor in fibroblasts*. Biochem Biophys Res Commun. 351(4): 808-14

Oosterwijk E., Van Muijen G.N., Oosterwijk-Wakka J.C., Warnaar S.O. (1990) *Expression of intermediate-sized filaments in developing and adult human kidney and in renal cell carcinoma*. J Histochem Cytochem 38 (3): 385-92

Oosterwijk E., Rathmell W.K., Junker K., Brannon A.R., Pouliot F., Finley D.S., Mulders P.F., Kirkali Z., Uemura H., Belldegrun A. (2011) *Basic research in kidney cancer*. Eur Urol. 60(4): 622-33

Oppenheimer S.B. (2006) Cellular basis of cancer metastasis: a review of fundamentals and new advances. Acta histochemica 108: 327-34

Ouadid-Ahidouch H., Dhennin-Duthille I., Gautier M., Sevestre H., Ahidouch A. (2012) *TRP* calcium channel and breast cancer: expression, role and correlation with clinical parameters. Bull Cancer 99(6): 655-664

Paget S. (1989) *The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889.* Cancer Metastasis Rev. 8(2): 98-101

Patel S.R., Ke H.Q., Vanholder R., Hsu C.H. (1994) *Inhibition of nuclear uptake of calcitriol receptor by uremic ultrafiltrate*. Kidney Int 46(1): 129-33

Patel S.R., Ke H.Q., Vanholder R., Koenig R.J., Hsu C.H. (1995) *Inhibition of calcitriol* receptor binding to vitamin D response elements by uremic toxins. J Clin Invest 96(1): 50-9

Pantuck A.J., Seligson D.B., Klatte T., Yu H., Leppert J.T., Moore L., O'Toole T., Gibbons J., Belldegrun A.S., Figlin R.A. (2007) *Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma*. Cancer 109(11): 2257-67

Paule B., Brion N. (2003) EGF receptors in urological cancer. Molecular basis and therapeutic involvements. Ann Med Interne 154(7): 448-56

Peacock M. (1980) *Hypercalcaemia and calcium homeostasis*. Metab Bone Dis & Rel Res 2: 143-150

Pelicci G., Lanfrancone L., Grignani F., McGlade J., Cavallo F., Forni G., Nicoletti I., Grignani F., Pawson T., Pelicci P.G. (1992) *A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction*. Cell 70(1): 93-104

Pick A.M., Nystrom K.K. (2012) Pazopanib for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. Clin Ther 34(3): 511-20

Plattfaut E. (2011) *Involvierung des TRPM7-Gens in Prozesse der Tumorgenese*. Dissertation im Fachbereich Medizin der Universitätsmedizin Mainz

Polte T.R., Hanks S.K. (1995) Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas. Proc Natl Acad Sci USA 92(23): 10678-82

Prevarskaya N., Zhang L., Barritt G. (2007) *TRP channels in cancer*. Biochimica et Biophysica Acta 1772: 937–946

Psaila B., Lyden D. (2009) *The metastatic niche: adapting the foreign soil*. Nat Rev Cancer 9(4): 285-93

Rathmell W.K., Chen S. (2008) VHL Inactivation in Renal Cell Carcinoma: Implications for Diagnosis, Prognosis and Treatment. Expert Rev Anticancer Ther. 8(1): 63–73

Ravichandran K.S. (2001) Signaling via Shc family adapter proteins. Oncogene 20: 6322-6330

Reh C.M., Hendy G.N., Cole D.E., Jeandron D.D. (2011) Neonatal hyperparathyroidism with a heterozygous calcium-sensing receptor (CASR) R185Q mutation: clinical benefit from cinacalcet. J Clin Endocrinol Metab 96(4): E707-12

Renkema K.Y., Velic A., Dijkman H.B., Verkaart S., van der Kemp A.W., Nowik M., Timmermans K., Doucet A., Wagner C.A., Bindels R.J., Hoenderop J.G. (2009) *The calciumsensing receptor promotes urinary acidification to prevent nephrolithiasis*. J Am Soc Nephrol 20(8): 1705-13

Riccardi D., Brown E.M. (2010) *Physiology and pathophysiology of the calcium-sensing receptor in the kidney*. Am J Physiol Renal Physiol 298: F485-F499

Riccardi D., Hall A.E., Chattopadhyay N., Xu J.Z., Brown E.M., Hebert S.C. (1998) *Localization of the extracellular Ca2+/polyvalent cation-sensing protein in rat kidney*. Am J Physiol 274(3 Pt 2): F611-22

Rodrigues L.S., Cáu A.C., Bussmann L.Z., Bastida G., Brunetto O.H., Corrêa P.H., Martin R.M. (2011) *New mutation in the CASR gene in a family with familial hypocalciuric hypercalcemia (FHH) and neonatal severe hyperparathyroidism (NSHPT)*. Arq Bras Endocrinol Metabol 55(1): 67-71

Rogers K.V., Dunn C.K., Conklin R.L., Hadfield S., Petty B.A., Brown E.M., Hebert S.C., Nemeth E.F., Fox J. (1995) *Calcium receptor messenger ribonucleic acid levels in the parathyroid glands and kidney of vitamin D-deficient rats are not regulated by plasma calcium or 1,25-dihydroxyvitamin D3*. Endocrinology 136(2): 499-504

Roodman G.D. (2004) Mechanisms of Bone Metastasis. N Engl J Med 350: 1655-64

Sadeq V., Isar N., Manoochehr T. (2011) Association of sporadic breast cancer with PTEN/MMAC1/TEP1 promoter hypermethylation. Med Oncol 28(2): 420-3

Saidak Z., Mentaverri R., Brown E.M. (2009a) *The role of the calcium-sensing receptor in the development and progression of cancer*. Endocrine Reviews 30(2): 178–195

Saidak Z., Boudot C., Abdoune R., Petit L., Brazier M., Mentaverri R., Kamel S. (2009b) *Extracellular calcium promotes the migration of breast cancer cells through the activation of the Calcium sensing receptor*. Exp Cell Research 315: 2072-2080

Saidak Z., Brazier M., Kamel S., Mentaverri R. (2009c) Agonists and Allosteric Modulators of the Calcium-Sensing Receptor and Their Therapeutic Applications. Mol Pharmacol 76: 1131–1144

Sakamaki Y., Inaba Y., Yoshimoto N., Yamamoto K. (2010) Potent antagonist for the vitamin D receptor: vitamin D analogues with simple side chain structure. J Med Chem 53(15): 5813-26

Santoni G., Farfariello V., Amantini C. (2011) TRPV channels in tumor growth and progression. Adv Exp Med Biol 704: 947-67

Sarbassov D.D., Guertin D.A., Ali S.M., Sabatini D.M. (2005) *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. Science 307(5712): 1098-101

Schlüter K., Gassmann P., Enns A., Korb T., Hemping-Bovenkerk A., Hölzen J., Haier J. (2006) Organ-Specific Metastatic Tumor Cell Adhesion and Extravasation of Colon Carcinoma Cells with Different Metastatic Potential. Am J Pathol. 169(3): 1064-73

Schmidt R.F., Lang F., Thews G. (2005) Physiologie des Menschen. Springer-Verlag, 29. Auflage

Schmitz M., Grignard G., Margue C., Dippel W., Capesius C., Mossong J., Nathan M., Giacchi S., Scheiden R., Kieffer N. (2007) *Complete loss of PTEN expression as a possible early prognostic marker for prostate cancer metastasis.* Int J Cancer 120(6): 1284-92.

Schneider E. (2008) Mechanismen der Migrationskontrolle durch PTEN in Nierenkarzinomzellen. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg Universität Mainz

Schneider E., Keppler R., Prawitt D., Steinwender C., Roos F.C., Thüroff J.W., Lausch E., Brenner W. (2011) *Migration of renal tumor cells depends on dephosphorylation of Shc by PTEN*. Int J Oncol. 38(3): 823-31

Schöndorf T., Ebert M.P., Hoffmann J., Becker M., Moser N., Pur S., Göhring U.J., Weisshaar M.P. (2004) *Hypermethylation of the PTEN gene in ovarian cancer cell lines*. Cancer Lett 207(2): 215-20

Shaw R.J., Cantley L.C. (2006) *Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth.* Nature 441: 424-430

Sherbet G.V., Lakshmi M.S. (1998) S100A4 (MTS1) calcium binding protein in cancer growth, invasion and metastasis. Anticancer Res 18(4A): 2415-21

Smith M.R. (2005) Zoledronic acid to prevent skeletal complications in cancer: Corroborating the evidence. Cancer Treatment Reviews 31: 19-25

Soussi T., Lozano G. (2005) *p53 mutation heterogeneity in cancer*. Biochem Biophys Res Commun 331(3): 834-42.

Spangenberg C., Lausch U.E., Trost T.M., Prawitt D., May A., Keppler R., Fees S.A., Reutzel D., Bell C., Schmitt S., Schiffer I.B., Weber A., Brenner W., Hermes M., Sahin U., Turaci O.,

Koelbl H., Hengstler J.G., Zabel B.U. (2006) *ERBB2-Mediated Transcriptional Upregulation* of the A5B1 Integrin Fibronectin Receptor Promotes Tumor Cell Survival Under Adverse Conditions. Cancer Research 66(7): 3715-3725

Störkel S. (1999) *Epithelial tumors of the kidney. Pathological subtyping and cytogenetic correlation.* Urologe A, 38(5): 425-32

Strell C., Entschladen F. (2008) *Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells*. Cell Commun Signal 6: 10

Strewler G.J., Williams R.D., Nissenson R.A. (1983) *Human Renal Carcinoma Cells Produce Hypercalcemia in the Nude Mouse and a Novel Protein Recognized by Parathyroid Hormone Receptors.* J. Clin. Invest. The American Society for Clinical Investigation, Inc. Volume 71: 769-774

Swanson D.A. (2004) Surgery for metastases of renal cell carcinoma. Scand J Surg. 93(2): 150-5

Tabata T., Kano M. (2004) Calcium dependence of native metabotropic glutamate receptor signaling in central neurons. Mol Neurobiol 29(3): 261-70

Tamura M., Gu J., Tran H., Yamada K.M. (1999) *PTEN gene and integrin signaling in cancer*. Journal of the National Cancer Institute 91: 1820-28

Terpe H.J., Tajrobehkar K., Günthert U., Altmannsberger M. (1993) *Expression of cell adhesion molecules alpha-2, alpha-5 and alpha-6 integrin, E-cadherin, N-CAM and CD-44 in renal cell carcinomas.* An immunohistochemical study. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 422(3): 219-24

Tfelt-Hansen J., Chattopadhyay N., Yano S., Kanuparthi D., Rooney P., Schwarz P., Brown E.M. (2004) *Calcium-sensing receptor induces proliferation through p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase but not extracellularly regulated kinase in a model of humoral hypercalcemia of malignancy*. Endocrinology 145(3): 1211-1217

Tfelt-Hansen J., MacLeod R.J., Chattopadhyay N., Yano S., QuinnS., Ren X., Terwilliger E.F., Schwarz P., Brown E.M. (2003) *Calcium-sensing receptor stimulates PTHrP release by pathways dependent on PKC, p38 MAPK, JNK, and ERK1/2 in H-500 cells.* Am J Physiol Endocrinol Metab 285: E329–E337

Tharmalingam S., Daulat A.M., Antflick J.E., Ahmed S.M., Nemeth E.F., Angers S., Conigrave A.D., Hampson D.R. (2011) *Calcium-sensing receptor modulates cell adhesion and migration via integrins*. J Biol Chem 286(47): 40922-33

Toker A., Newton A.C. (2000) *Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site.* J Biol Chem 275(12): 8271-4

Turner C.E. (1998) Paxillin. Int J Biochem Cell Biol 30(9): 955-9

Ucar D.A., Hochwald S.N. (2010) FAK and interacting proteins as therapeutic targets in pancreatic cancer. Anticancer Agents Med Chem 10(10): 742-6

Uygur M.C., Usubütün A., Özen H., Ayhan A., Kendi S. (1998) *Prognostic factors and the role of nephrectomy in metastatic renal cell carcinoma*. J. Exp. Clin. Cancer Res. 18(3): 397-401

Valastyan S., Weinberg R.A. (2011) Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. Cell 147: 275-292

Veer L.J., Dai H., van de Vijver M.J., He Y.D., Hart A.A., Mao M., Peterse H.L., van der Kooy K., Marton M.J., Witteveen A.T., Schreiber G.J., Kerkhoven R.M., Roberts C., Linsley P.S., Bernards R., Friend S.H. (2002) *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer*. Nature 415(6871): 530-6

Vijver M.J., He Y.D., van't Veer L.J., Dai H., Hart A.A., Voskuil D.W., Schreiber G.J., Peterse J.L., Roberts C., Marton M.J., Parrish M., Atsma D., Witteveen A., Glas A., Delahaye L., van der Velde T., Bartelink H., Rodenhuis S., Rutgers E.T., Friend S.H., Bernards R. (2002) *A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer*. N Engl J Med. 19; 347(25): 1999-2009

Vogel W.F. (2001) *Collagen-receptor signaling in health and disease*. Eur J Dermatol 11(6): 506-14

Wagner E.F., Nebreda A.R. (2009) Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. Nat Rev Cancer 9(8): 537-49

Wang X., Chao L., Zhen J., Chen L., Ma G., Li X. (2010) *Phosphorylated c-Jun NH2*terminal kinase is overexpressed in human papillary thyroid carcinomas and associates with lymph node metastasis. Cancer Lett 293(2): 175-80

Wang X., Trotman L.C., Koppie T., Alimonti A., Chen Z., Gao Z., Wang J., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Cordon-Cardo C., Chi S.-G., Pandolfi P.P., Jiang X. (2007) *Nedd4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin-ligase for PTEN*. Cell 128: 129-39

Warburton H.E., Brady M., Vlatković N., Linehan W.M., Parsons K., Boyd M.T. (2005) *p53* regulation and function in renal cell carcinoma. Cancer Res 65(15): 6498-503.

Weber K.L., Doucet M., Price J.E. (2003) *Renal cell carcinoma bone metastasis: epidermal growth factor receptor targeting.* Clin Orthop Relat Res. 2003 Oct;(415 Suppl):S86-94

Weber K., Doucet M., Kominsky S. (2007) *Renal cell carcinoma bone metastasis - elucidating the molecular targets.* Cancer Metastasis Rev 26: 691–704

Weinberg R.A. (2007) The biology of cancer. Garland Science, 1. Auflage

Welsch U. (2005) Lehrbuch Histologie. Elsevier 2. Auflage

Wikman H., Lamszus K., Detels N., Uslar L., Wrage M., Benner C., Hohensee I., Ylstra B., Eylmann K., Zapatka M., Sauter G., Kemming D., Glatzel M., Müller V., Westphal M., Pantel K. (2012) *Relevance of PTEN loss in brain metastasis formation in breast cancer patients*. Breast Cancer Res 14(2): R49

Wise A., Green A., Main M.J., Wilson R., Fraser N., Marshall F.H. (1999) *Calcium sensing* properties of the GABAB receptor. Neuropharmacology 38: 1647–1656

Woodward E., Jagdev S., McParland L., Clark K., Gregory W., Newsham A., Rogerson S., Hayward K., Selby P., Brown J. (2011) *Skeletal complications and survival in renal cancer patients with bone metastases*. Bone 48: 160–166

Wu Z., McRoberts K.S., Theodorescu D. (2007) *The role of PTEN in prostate cancer cell tropism to the bone micro-environment*. Carcinogenesis 28(7): 1393-1400

www.atcc.org

www.radiologie-uni-frankfurt.de/content/e4864/e27/e2912/e5867/e5868/index_ger.html

www.uniklinik-freiburg.de/thoraxchirurgie/live/krankheitsbilder/lungenmetastasen.html

Xing W.J., Kong F.J., Li G.W., Qiao K., Zhang W.H., Zhang L., Bai S.Z., Xi Y.H., Li H.X., Tian Y., Ren H., Wu L.Y., Wang R., Xu C.Q. (2011) *Calcium-sensing receptors induce apoptosis during simulated ischaemia-reperfusion in Buffalo rat liver cells*. Clin Exp Pharmacol Physiol 38(9): 605-12

Yamada K.M., Araki M. (2001) *Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis.* Journal of Cell Science 114: 2375-82

Yamazaki D., Kurisu S., Takenawa T. (2005) *Regulation of cancer cell motility through actin reorganization*. Cancer Sci 96(7): 379-86

Yang S.D., Sun R.C., Mu H.J., Xu Z.Q., Zhou Z.Y. (2010) *The expression and clinical significance of TGF-beta1 and MMP2 in human renal clear cell carcinoma*. Int J Surg Pathol. 18(2): 85-93

Yin J.J., Pollock C.B., Kelly K. (2005) *Mechanisms of cancer metastasis to the bone*. Cell Research 15(1): 57-62

Younes M.N., Yigitbasi O.G., Park Y.W., Kim S.J., Jasser S.A., Hawthorne V.S., Yazici Y.D., Mandal M., Bekele B.N., Bucana C.D., Fidler I.J., Myers J.N. (2005) Antivascular therapy of human follicular thyroid cancer experimental bone metastasis by blockade of epidermal growth factor receptor and vascular growth factor receptor phosphorylation. Cancer Res 65(11): 4716-27

Zarubin T., Han J. (2005) *Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway*. Cell Res 15(1): 11-8

Zekri J, Ahmed N, Coleman RE, Hancock BW (2001) *The skeletal metastatic complications* of renal cell carcinoma. Int J Oncol. 19(2): 379-82

Zhang J.G., Wang J.J., Zhao F., Liu Q., Jiang K., Yang G.H. (2010) *MicroRNA-21 (miR-21)* represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). Clin Chim Acta 411(11-12): 846-52

Zhang Y., Pu X., Shi M., Chen L., Song Y., Qian L., Yuan G., Zhang H., Yu M., Hu M., Shen B., Guo N. (2007) *Critical role of c-Jun overexpression in liver metastasis of human breast cancer xenograft model*. BMC Cancer 7: 145.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ad	zu
Akt/PKB	Proteinkinase B
APS	Ammonium-Persulfat
Arp2/3	Actin related proteins 2/3
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CaSR	Calcium sensitiver Rezeptor
cDNA	copy DNA
DAB	Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiotreithol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
et al.	et aliae
Fa.	Firma
FAK	fokale Adhäsionskinase

FCS	fötales Kälberserum	
FGF	Fibroblast growth factor	
FN	Fibronektin	
GABA	γ-Aminobuttersäure	
GDP	Guanosindiphosphat	
GTP	Guanosintriphosphat	
HIF	Hypoxia-inducible transcription factors	
HRP	Horseradish Peroxidase	
IGF	Insulin-like growth factor	
IgG	Immunglobulin G	
IP ₃	Inositoltrisphosphat	
JNK	c-Jun N-Terminale Kinase	
kb	Kilobasen	
kDa	Kilo-Dalton	
KG	Kollagen	
LSAB	Labeled-Streptavidin-Biotin	
miRNA	micro RNA	
mRNA	messenger RNA	
mTOR	Mammalian target of rapamycin	
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase	
Nedd4-1	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-1	
NPS	2-Chloro-6-[(2 <i>R</i>)-3-[[1,1-dimethyl-2-(2-naphthalenyl)ethyl]amino-2-	
	hydroxypropoxy]benzonitrile Hydrochlorid	
NZK	Nierenzellkarzinom	
p130CAS	p130 Crk-associated substrate	
PBS	Phosphate buffered saline	
PCR	Polymerase chain reaction	
PDGF	Platelet-derived growth factor	
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor	
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase	
PDK-1	Phosphoinositide-dependent Kinase-1	
PI3K	Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase	
PIP	Phosphatidyl-Inositol-Phosphat	

PIP ₂	Phosphatidyl-Inostitol-(4,5)-Biphosphat
PIP ₃	Phosphatidyl-Inositol-(3,4,5)-Triphosphat
phospho bzw. p	phosphoryliert
РКА	Proteinkinase A
РКС	Proteinkinase C
ΡLCγ	Phospholipase Cδ
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride
РТН	Parathormon
PTHrP	PTH-related protein
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RC-1	CCF-RC-1
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyakryalamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
Shc	Src homology 2 domain containing-protein
Src	Sarcoma
Taq	Termophilus Aquaticus
TBP	TATA-Box Bindungsprotein
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	Transforming growth factor beta
Thr	Threonin
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TRP	Transient receptor potential channels
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
VHL	von Hippel-Lindau

WAS Wiskott-Aldrich Syndrom

Abkürzungen für Nukleotidbasen

А	Adenin
С	Cytosin
G	Guanin
Т	Thymidin
U	Uracil

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Nephron-/ Sammelrohrsystems	1
Abbildung 1.2: Die Hauptmetastasierungsorte des NZK: Lungen, Knochen, Leber, Gehirn und Lymphknoten	5
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Wirkmechanismen der Target- Therapeutika	7
Abbildung 1.4: Darstellung der einzelnen Schritte im Prozess der Metastasierung	10
Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der molekularen Prozesse, die zur Regulation der Metastasierung von Tumorzellen beitragen	12
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Mechanismen zur Regulation von Zellmigration und –adhäsion via FAK- und Akt-Signalweg	13
Abbildung 1.7: Unterschiedliche Calcium-Konzentrationen in den einzelnen Kompartimenten des Knochenmilieus	19
Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der bidirektionalen Interaktionen von metastasierenden Mammakarzinomzellen und Osteoklasten	21
Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der Wirkung von Calcium via CaSR auf verschiedene intrazelluläre Signalwege	23
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Boyden-Kammer.	48
Abbildung 2.2: Mikroskopische Aufnahme der migrierten Zellen	49
Abbildung 3.1: PCR zum Nachweis des CaSR in Normal- und Tumorgewebe von NZK-Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsorten	65
Abbildung 3.2: Expression der <i>CaSR</i> mRNA in Normal- und Tumorgewebe von NZK-Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsorten, bestimmt durch quantitative Real-Time PCR	66
Abbildung 3.3: Expression des CaSR-Proteins in Normal- und Tumorgewebe von NZK-Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsorten, bestimmt mittels Westernblot-Analysen	67

Abbildung 3.4: Immunzytochemische Färbung zum Nachweis des epithelialen Ursprungs der primären NZK-Zellen von Patienten ohne Metastasen
Abbildung 3.5: Immunzytochemische Färbung zum Nachweis des epithelialen Ursprungs der primären NZK-Zellen von Patienten mit Lungenmetastasen
Abbildung 3.6: Immunzytochemische Färbung zum Nachweis des epithelialen Ursprungs der primären NZK-Zellen von Patienten mit Knochenmetastasen
Abbildung 3.7: CaSR-Expression in primären NZK-Zellen von Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsorten mit und ohne Calcium-Behandlung, durchflusszytometrisch detektiert
Abbildung 3.8: Chemotaktische Migration primärer NZK-Zellen von Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsorten unter Verwendung von Fibronektin als Chemotaxin in der Boyden-Kammer
Abbildung 3.9:Adhäsion der primären NZK-Zellen aus Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsorten an Komponente der Extrazellularmatrix mit und ohne Calcium-Behandlung
Abbildung 3.10: Chemotaktische Migration primärer NZK-Zellen von Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsorten unter Verwendung von Calcium als Chemotaxinin der Boyden-Kammer
Abbildung 3.11: Proliferationsfähigkeit der primären NZK-Zellen von Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsorten mit und ohne Calcium-Behandlung, gemessen mittels BrdU-Inkorporation
Abbildung 3.12: Expression bzw. Aktivität verschiedener Signalmediatoren in primären NZK-Zellen von Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsorten mit und ohne Calcium-Behandlung, bestimmt in Westernblot-Analysen und mittels densitometrischer Auswertung der Proteinbanden
Abbildung 3.13: Phosphorylierungsstatus verschiedener intrazellulärer Signalmediatoren in primären NZK-Zellen von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen mit und ohne Calcium-Behandlung, analysiert mittels Phospho-Kinase-Array und densitometrischer Auswertung der Proteinbanden
Abbildung 3.14: Expression bzw. des Phosphorylierungsstatus verschiedener Signalmoleküle im Normalgewebe von NZK-Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsorten. bestimmt in Westernblot-Analysen und mittels densitometrischer Auswertung der Proteinbanden
Abbildung 3.15: Expression bzw. des Phosphorylierungsstatus verschiedener Signalmoleküle im Tumorgewebe von NZK-Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsorten, bestimmt in Westernblot-Analysen und mittels densitometrischer Auswertung der Proteinbanden
Abbildung 3.16: Vitalität primärer NZK-Zellen von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen nach Behandlung mit NPS 2143 bestimmt mittels MTT-Test, dargestellt im Säulendiagramm
Abbildung 3.17: Vitalität primärer NZK-Zellen von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen nach Behandlung mit NPS 2143 bestimmt mittels Alamarblau-Test, dargestellt im Säulendiagramm

Abbildung 3.18: Vergleich zweier Tests zum Nachweis der Vitalität primärer NZK-Zellen von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen nach Behandlung mit NPS 2143, dargestellt im Liniendiagramm91
Abbildung 3.19: Vitalität primärer NZK-Zellen von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen nach Behandlung mit NPS 2143 bestimmt mittels MTT-Test, dargestellt im Säulendiagramm
Abbildung 3.20: Vitalität primärer NZK-Zellen von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen nach Behandlung mit NPS 2143 bestimmt mittels MTT-Test, dargestellt im Säulendiagramm
Abbildung 3.21: Chemotaktische Migration der primären NZK-Zellen von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen nach Calcium- und NPS-Behandlung unter Verwendung von Calcium als Chemotaxin in der Boyden-Kammer
Abbildung 3.22: Proliferation der primären NZK-Zellen von Patienten ohne bzw. mit Knochenmetastasen nach Calcium- und NPS-Behandlung, bestimmt mittels BrdU-ELISA
Abbildung 3.23: Expression bzw. Aktivität verschiedener Signalmediatoren in primären NZK-Zellen von Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsorten nach Behandlung mit dem CaSR-Inhibitor NPS 2143 und Calcium, bestimmt durch Westernblot-Analysen und densitometrischer Auswertung der Proteinbanden
Abbildung 3.24: Expression des CaSR in konti-nuierlichen NZK-Zelllinien, bestimmt mittels Westernblot-Analysen und densitometrischer Auswertung der Proteinbanden
Abbildung 3.25: Chemotaktische Migration der kontinuierlichen NZK-Zelllinien unter Verwendung von Fibronektin als Chemotaxin in der Boyden-Kammer
Abbildung 3.26: Chemotaktische Migration der kontinuierlichen NZK-Zelllinien unter Verwendung von Calcium als Chemotaxin in der Boyden-Kammer
Abbildung 3.27: Proliferationsfähigkeit der kontinuierlichen NZK-Zelllinien nach Calcium-Behandlung, gemessen in einem BrdU-ELISA
Abbildung 3.28: Expressionen bzw. Aktivität verschiedener Signalmediatoren in kontinuierlichen NZK-Zelllinie nach Calcium-Behandlung, bestimmt durch Westernblot-Analysen und densitometrische Auswertung
Abbildung 3.29: Chemotaktische Migration kontinuierlicher NZK-Zelllinien nach Behandlung mit den TKI Sunitinib (A), Sorafenib (B) und Pazopanib (C), analysiert in der Boyden-Kammer
Abbildung 3.30: Proliferation kontinuierlicher NZK-Zelllinien nach Behandlung mit den TKI Sunitinib (A), Sorafenib (B) und Pazopanib (C), quantifiziert mittels BrdU-ELISA

Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der von Calcium aktivierten Signalweiterleitung via CaSR, die eine knochenspezifische NZK-Metastasierung begünstigt
Abbildung 4.2: Hypothetischer Mechanismus einer Reduktion der PTEN-Expression durch extrazelluläres Calcium unabhängig von CaSR
Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der molekularen Mechanismen, die eine knochenspezifische Metastasierung von NZK-Zellen fördern

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Empfehlungen zur medikamentösen Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms 7
Tabelle 2.1: Eingesetzte Mengen an Medium und Trypsin pro Zellkulturflaschemit unterschiedlichen Bodenflächen42
Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressionsanalysen des CaSR in NZK-Gewebeproben und primären NZK-Zellen
Tabelle 4.2: Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellmigration und -proliferationder NZK-Zellen mit unterschiedlichem Metastasierungsstatus115
Tabelle 4.3: Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressions-Analysen von primären NZK-Zellen 119
Tabelle 4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse des Phospho-Kinase-Arrays mit primären NZK-Zellen 119
Tabelle 4.5: Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressionsanalyen primärer NZK-Zellen mit und ohne Inhibitor (NPS 2143)-Behandlung
Tabelle 4.6: Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressions-/ Aktivitätsanalysenprimärer NZK-Zellen131
Tabelle 4.7: Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressions-/ Aktivitätsanalysenvon NZK-Gewebeproben131
Tabelle 4.8: Zusammenfassung der Ergebnisse der CaSR-Expressionsanalyse, derZellmigration und -proliferation der kontinuierlichen NZK-Zellen
Tabelle 4.9: Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressionsanalysenkontinuierlicher NZK-Zelllinien

7.4 Werte zu den Abbildungen

werte zu Abbildung 3.2	Werte zu	Abbildung	3.2
------------------------	----------	-----------	-----

0			
	keine Metastasen	Lungenmetastasen	Knochenmetastasen
Median Normalgewebe	0,180364372	0,241935484	0,415277778
Median Tumorgewebe	0,001268713	0,000359654	0,013641618

	keine Metastasen	Lungenmetastasen	Knochenmetastasen
Median Normalgewebe	0,904873093	1,105864832	1,152850112
Median Tumorgewebe	1,428337172	1,548969825	1,486136513

Werte zu Abbildung 3.7

	keine Metastasen	Lungenmetastasen	Knochenmetastasen
Mittelwert in %	100	193,95	372,61
Standardfehler in %	6,243	10,708	62,830

Werte zu Abbildung 3.8

	keine Metastasen	Lungenmetastasen	Knochenmetastasen
Mittelwert in %	100	337,956	1349,895
Standardfehler in %	23,984	113,941	504,689

Werte zu Abbildung 3.9

-				
Mittelwert in %	BSA	Fibronektin	Kollagen I	Kollagen IV
keine Metastasen unbehandelt	100	97,319	87,456	89,321
keine Metastasen Calcium	89,404	73,685	73,229	73,769
Lungenmetastasen unbehandelt	100	195,110	252,925	104,202
Lungenmetastasen Calcium	51,330	44,294	70,701	56,954
Knochenmetastasen unbehandelt	100	629,160	778,310	103,985
Knochenmetastasen Calcium	90,507	689,109	813,827	133,189
Standardfehler in %	BSA	Fibronektin	Kollagen I	Kollagen IV
Standardfehler in % keine Metastasen unbehandelt	BSA 0	Fibronektin 1,811	Kollagen I 7,681	Kollagen IV 10,491
Standardfehler in % keine Metastasen unbehandelt keine Metastasen Calcium	BSA 0 2,811	Fibronektin 1,811 2,758	Kollagen I 7,681 1,033	Kollagen IV 10,491 10,935
Standardfehler in % keine Metastasen unbehandelt keine Metastasen Calcium Lungenmetastasen unbehandelt	BSA 0 2,811 0	Fibronektin 1,811 2,758 113,583	Kollagen I 7,681 1,033 173,020	Kollagen IV 10,491 10,935 26,339
Standardfehler in % keine Metastasen unbehandelt keine Metastasen Calcium Lungenmetastasen unbehandelt Lungenmetastasen Calcium	BSA 0 2,811 0 10,884	Fibronektin 1,811 2,758 113,583 6,038	Kollagen I 7,681 1,033 173,020 10,811	Kollagen IV 10,491 10,935 26,339 22,347
Standardfehler in % keine Metastasen unbehandelt keine Metastasen Calcium Lungenmetastasen unbehandelt Lungenmetastasen Calcium Knochenmetastasen unbehandelt	BSA 0 2,811 0 10,884 0	Fibronektin 1,811 2,758 113,583 6,038 176,374	Kollagen I 7,681 1,033 173,020 10,811 169,896	Kollagen IV 10,491 10,935 26,339 22,347 23,295

Werte zu Abbildung 3.10

	keine Metastasen	Lungenmetastasen	Knochenmetastasen
Mittelwert in %	100	379,073	1899,410
Standardfehler in %	24,122	202,140	743,642

	6		
Mittelwert in %	keine Metastasen	Lungenmetastasen	Knochenmetastasen
unbehandelt	100	100	100
2,5 mM Calcium	90,588	105,018	111,365
5 mM Calcium	86,469	107,440	204,982
10 mM Calcium	89,168	119,692	230,302
Standardfehler in %	keine Metastasen	Lungenmetastasen	Knochenmetastasen
unbehandelt	0	0	0
2,5 mM Calcium	7,569	2,120	8,880
5 mM Calcium	12,465	15,122	89,769
10 mM Calcium	7,123	35,885	91,464

	Integrin $\alpha 5$	pShc	pFAK	pErk		
Mittelwert in %						
keine Metastasen unbehandelt	100	100	100) 100)	
keine Metastasen Calcium	106,180	46,698	105,547	7 37,319)	
Lungenmetastasen unbehandelt	141,226	36,646	82,038	41,933	3	
Lungenmetastasen Calcium	149,062	17,241	146,352	2 15,179)	
Knochenmetastasen unbehandelt	430,140	35,567	357,249	36,785	5	
Knochenmetastasen Calcium	317,103	34,272	422,800	23,639)	
Standardfehler in %						
keine Metastasen unbehandelt	55,777	44,747	38,522	2 56,437	7	
keine Metastasen Calcium	54,984	14,548	65,979	23,076	5	
Lungenmetastasen unbehandelt	28,094	25,846	15,902	19,411		
Lungenmetastasen Calcium	40,474	11,316	88,824	6,633	3	
Knochenmetastasen unbehandelt	151,263	10,981	116,469	3,566	5	
Knochenmetastasen Calcium	79,238	12,307	87,563	6,540)	
	pAkt (T30	8) pAkt	(S473)	PTEN	Nedd4.1	
Mittelwert in %						
keine Metastasen unbehandelt	1	00	100	100	0 100	
keine Metastasen Calcium	97,2	31	92,160	7,761	33,472	
Lungenmetastasen unbehandelt	180,1	77	103,951	56,730	53,433	
Lungenmetastasen Calcium	129,3	63	63,111	2,743	3 18,635	
Knochenmetastasen unbehandelt	89,0	09	173,903	55,353	3 138,739	
Knochenmetastasen Calcium	113,8	50	140,323	1,053	60,090	
Standardfehler in %						
keine Metastasen unbehandelt	29,1	65	45,776	32,741	31,426	
keine Metastasen Calcium	26,5	66	51,944	6,154	10,766	
Lungenmetastasen unbehandelt	49,2	15	17,616	29,781	29,770	
Lungenmetastasen Calcium	16,4	52	30,029	0,619	9 4,722	
Knochenmetastasen unbehandelt	31,4	97	43,092	13,901	67,547	
Knochenmetastasen Calcium	19,6	88	56,463	0,793	15,761	
Werte zu Abbildung 3.13	Werte zu Abbildung 3 13					
Mittelwert in %	pErk	p-p38	βα pF	PLCv1	pJNK	
kaina Mataataaan unhahandalt	100		100	100	100	

keine Metastasen unbehandelt 100 100 100 100 keine Metastasen Calcium 28,417 46,122 82,846 58,871 Knochenmetastasen unbehandelt 32,431 86,552 85,120 81,708 Knochenmetastasen Calcium 42,550 140,064 120,380 115,499 Mittelwert in % p-c-Jun pPaxillin pAkt (S473) pAkt (T308) keine Metastasen unbehandelt 100 100 100 keine Metastasen Calcium 88,510 86,054 68,960 78,588 Knochenmetastasen unbehandelt 96,393 70,763 496,834 90,606 Knochenmetastasen Calcium 128,989 109,916 662,248 133,702	Mittelwert in %	pErk	ρ-p38α	pPLCγ1	pJNK	
keine Metastasen Calcium 28,417 46,122 82,846 58,871 Knochenmetastasen unbehandelt 32,431 86,552 85,120 81,708 Knochenmetastasen Calcium 42,550 140,064 120,380 115,499 Mittelwert in % p-c-Jun pPaxillin pAkt (S473) pAkt (T308) keine Metastasen unbehandelt 100 100 100 keine Metastasen Calcium 88,510 86,054 68,960 78,588 Knochenmetastasen unbehandelt 96,393 70,763 496,834 90,606 Knochenmetastasen Calcium 128,989 109,916 662,248 133,702	keine Metastasen unbehandelt	100	100	100	100	
Knochenmetastasen unbehandelt 32,431 86,552 85,120 81,708 Knochenmetastasen Calcium 42,550 140,064 120,380 115,499 Mittelwert in % p-c-Jun pPaxillin pAkt (S473) pAkt (T308) keine Metastasen unbehandelt 100 100 100 100 keine Metastasen Calcium 88,510 86,054 68,960 78,588 Knochenmetastasen unbehandelt 96,393 70,763 496,834 90,606 Knochenmetastasen Calcium 128,989 109,916 662,248 133,702	keine Metastasen Calcium	28,417	46,122	82,846	58,871	
Knochenmetastasen Calcium 42,550 140,064 120,380 115,499 Mittelwert in % p-c-Jun pPaxillin pAkt (S473) pAkt (T308) keine Metastasen unbehandelt 100 100 100 100 keine Metastasen Calcium 88,510 86,054 68,960 78,588 Knochenmetastasen unbehandelt 96,393 70,763 496,834 90,606 Knochenmetastasen Calcium 128,989 109,916 662,248 133,702	Knochenmetastasen unbehandelt	32,431	86,552	85,120	81,708	
Mittelwert in % p-c-Jun pPaxillin pAkt (S473) pAkt (T308) keine Metastasen unbehandelt 100 100 100 100 keine Metastasen Calcium 88,510 86,054 68,960 78,588 Knochenmetastasen unbehandelt 96,393 70,763 496,834 90,606 Knochenmetastasen Calcium 128,989 109,916 662,248 133,702	Knochenmetastasen Calcium	42,550	140,064	120,380	115,499	
keine Metastasen unbehandelt100100100keine Metastasen Calcium88,51086,05468,96078,588Knochenmetastasen unbehandelt96,39370,763496,83490,606Knochenmetastasen Calcium128,989109,916662,248133,702	Mittelwert in %	p-c-Jun	pPaxillin	pAkt (S473)pAkt (T308	3)
keine Metastasen Calcium88,51086,05468,96078,588Knochenmetastasen unbehandelt96,39370,763496,83490,606Knochenmetastasen Calcium128,989109,916662,248133,702	keine Metastasen unbehandelt	100	100	100	100)
Knochenmetastasen unbehandelt 96,393 70,763 496,834 90,606 Knochenmetastasen Calcium 128,989 109,916 662,248 133,702	keine Metastasen Calcium	88,510	86,054	68,960	78,588	3
Knochenmetastasen Calcium 128,989 109,916 662,248 133,702	Knochenmetastasen unbehandelt	96,393	70,763	496,834	90,606	3
	Knochenmetastasen Calcium	128,989	109,916	662,248	133,702	2

Werte zu Abbildung 3.14

Median	Integrin α5	pShc	pFAK	pErk	pAkt	PTEN
keine Metastasen	0,862	1,243	0,721	1,697	1,017	1,484
Lungenmetastasen	1,009	0,846	0,615	2,205	1,197	1,281
Knochenmetastasen	1,287	1,221	0,652	2,611	1,974	1,201

Median	Integrin α5	pShc	pFAK	pErk	pAkt	PTEN
keine Metastasen	0,686	1,715	0,730	1,976	1,300	0,879
Lungenmetastasen	1,573	1,135	0,742	3,128	1,342	0,951
Knochenmetastasen	2,004	0,973	0,552	2,184	1,869	0,654

MTT						
Mittelwert in %	unbehandelt	0,5 µM NPS	1 μM NPS	5 µM NPS	10 µM NPS	100 µM NPS
keine Metastasen	100	101,154	96,104	84,367	78,716	4,545
Knochenmetastasen	100	121,793	110,280	113,158	112,582	9,293
Standardabweichung in %	unbehandelt	0,5 µM NPS	1 μM NPS	5 µM NPS	10 µM NPS	100 µM NPS
keine Metastasen	11,961	11,263	4,480	5,043	10,840	0,433
Knochenmetastasen	5,270	5,092	3,475	3,878	7,189	0,493
Kristallviolett						
Mittelwert in %	unbehandelt	0,5 µM NPS	1 μM NPS	5 µM NPS	10 µM NPS	$100 \ \mu M \ NPS$
keine Metastasen	100	107,600	103,729	100,641	105,173	107,065
Knochenmetastasen	100	98,293	98,415	91,650	89,232	61,987
Standardabweichung in %	unbehandelt	0,5 µM NPS	1 μM NPS	5 µM NPS	10 µM NPS	100 µM NPS
keine Metastasen	4,281	8,012	1,793	4,249	9,229	2,854
Knochenmetastasen	14,727	8,139	13,425	5,534	0,775	2,044

Werte zu Abbildung 3.17

Alamarblau						
Mittelwert in %	unbehandelt	0,5 µM NPS	1 μM NPS	5 µM NPS	10 µM NPS	100 µM NPS
keine Metastasen	100	86,279	94,343	91,939	83,600	72,734
Knochenmetastasen	100	105,310	103,049	99,908	97,779	49,941
Standardabweichung in %	unbehandelt	0,5 µM NPS	1 μM NPS	5 µM NPS	10 µM NPS	100 µM NPS
keine Metastasen	38,157	20,189	19,521	13,505	2,295	14,839
Knochenmetastasen	2,497	5,774	2,084	0,000	0,000	1,100
Kristallviolett						
Mittelwert in %	unbehandelt	0,5 µM NPS	1 μM NPS	5 µM NPS	10 µM NPS	100 µM NPS
keine Metastasen	100	103,145	106,503	104,242	106,470	71,908
Knochenmetastasen	100	104,131	100,602	101,664	97,935	38,640
Standardabweichung in %	unbehandelt	0,5 µM NPS	1 μM NPS	5 µM NPS	10 µM NPS	100 µM NPS
keine Metastasen	5,090	2,363	7,945	5,958	3,269	13,814
Knochenmetastasen	5,651	13,486	5,744	6,143	7,571	4,000

Werte zu Abbildung 3.19

MTT						
Mittelwert in %	unbehandelt	0,5 µM NPS	1 µM NPS	5 µM NPS	10 µM NPS	100 µM NPS
keine Metastasen	100	99,512	88,565	70,013	50,811	8,938
Knochenmetastasen	100	93,778	90,362	78,498	70,327	11,316
Standardabweichung in %	unbehandelt	0,5 µM NPS	1 μM NPS	5 µM NPS	10 µM NPS	100 µM NPS
keine Metastasen	0	4,890	4,719	4,776	3,055	2,557
Knochenmetastasen	0	5,801	4,076	11,460	19,703	1,182
Kristallviolett						
Mittelwert in %	unbehandelt	0,5 µM NPS	1 μM NPS	5 µM NPS	10 µM NPS	100 µM NPS
keine Metastasen	100	97,780	95,029	92,765	89,688	33,645
Knochenmetastasen	100	104,849	102,218	101,388	95,923	42,901
Standardabweichung in %	unbehandelt	0,5 µM NPS	1 μM NPS	5 µM NPS	10 µM NPS	100 µM NPS
keine Metastasen	0	3,780	4,194	1,777	5,755	12,498
Knochenmetastasen	0	6,073	3,722	6,198	2,704	3,219

Mittelwert in %	unbehandelt	5 mM Calcium	5 µM NPS	5 mM Calcium + 5 µM NPS
keine Metastasen	100	98,454	123,945	132,332
Knochenmetastasen	100	102,571	19,295	47,239
Standardfehler in %	unbehandelt	5 mM Calcium	5 µM NPS	5 mM Calcium + 5 µM NPS
keine Metastasen	0	16,491	49,019	37,852
Knochenmetastasen	0	21,396	5,783	8,243

Mittelwert in %	unbehandelt	5 mM Calcium	5 µM NPS	5 mM Calcium + 5 µM NPS
keine Metastasen	100	92,746	94,023	80,651
Knochenmetastasen	100	109,495	95,151	100,457
Standardfehler in %	unbehandelt	5 mM Calcium	5 µM NPS	5 mM Calcium + 5 µM NPS
keine Metastasen	0	7,537	10,577	7,076
Knochenmetastasen	0	1,622	4,632	5,327

Werte zu Abbildung 3.23

Median in %	pAkt (T308)	pAkt (S473)	pErk	PTEN
keine Metastasen unbehandelt	100	100	100	100
keine Metastasen NPS	86,048	93,679	146,082	82,908
keine Metastasen NPS+Calcium	84,673	88,740	138,663	66,306
Knochenmetastasen unbehandelt	89,009	121,475	104,372	55,353
Knochenmetastasen NPS	58,295	99,248	20,140	52,485
Knochenmetastasen NPS+Calcium	69,900	80,635	22,785	49,072
Standardfehler in %				
keine Metastasen unbehandelt	29,165	28,867	18,450	32,741
keine Metastasen NPS	34,572	11,970	31,089	19,283
keine Metastasen NPS+Calcium	24,446	25,991	19,071	14,318
Knochenmetastasen unbehandelt	25,717	21,252	46,489	13,901
Knochenmetastasen NPS	10,674	33,390	6,427	8,878
Knochenmetastasen NPS+Calcium	15,647	30,932	0,235	9,973

Werte zu Abbildung 3.24

	A-498	786-O	Dibo	RC-1
relative Einheiten	0,164	0,005	0,292	0,101

Werte zu Abbildung 3.25

	A-498	786-O	Dibo	RC-1
Mittelwert	241,667	610,5	674,667	693,417
Standardfehler	29,122	90,631	73,757	84,848

Werte zu Abbildung 3.26

	A-498	786-O	Dibo	RC-1
Mittelwert	9,5	2,25	19	12,792
Standardfehler	4,219	1,837	3,810	4,525

Mittelwert in %	A-498	786-O	Dibo	RC-1
unbehandelt	100	100	100	100
2,5 mM Calcium	97,293	99,779	131,776	133,893
5 mM Calcium	103,397	97,024	313,290	92,964
10 mM Calcium	104,759	101,039	360,999	128,078
Standardfehler in %	A-498	786-O	Dibo	RC-1
unbehandelt	0	0,000	0	0
2,5 mM Calcium	1,221	0,479	1,241	3,846
5 mM Calcium	4,072	1,164	45,834	14,315
10 mM Calcium	5,245	0,510	19,293	4,010

Median	Integrin α5	pShc	pFAK	pErk	pAkt	PTEN
A-498 unbehandelt	0,509	2,542	0,209	1,317	0,630	1,239
A-498 Calcium	0,150	2,260	0,183	1,961	1,089	0,709
786-O unbehandelt	0,580	2,618	0,964	1,233	0,905	0,063
786-O Calcium	0,686	2,454	0,740	1,424	0,917	0,043
Dibo unbehandelt	0,904	2,194	0,432	1,141	0,327	0,823
Dibo Calcium	0,849	2,198	0,749	1,292	0,855	0,633
RC-1 unbehandelt	0,960	1,797	0,714	0,649	0,197	0,480
RC-1 Calcium	0,955	1,632	1,009	0,974	0,495	0,298

Werte zu Abbildung 3.29

	MW				Stabw			
Sunitinib	786-O	A-498	Dibo	RC-1	786-O	A-498	Dibo	RC-1
unbehandelt	100	100	100	100	27	5	6	4
1 µM	145	89	84	46	10	0	8	12
5 µM	105	112	77	57	28	1	10	7
10 µM	49	82	81	22	4	7	12	4
Sorafenib	786-O	A-498	Dibo	RC-1	786-O	A-498	Dibo	RC-1
unbehandelt	100	100	100	100	27	5	6	4
1 µM	31	109	90	49,2582	12	4	12	9
5 µM	1	51	56	0,78188	1	6	6	0
10 µM	0	14	23	0	0	0	6	0
Pazopanib	786-O	A-498	Dibo	RC-1	786-O	A-498	Dibo	RC-1
unbehandelt	100	100	100	100	0	0	6	0
1 µM	106	117,5	93	98,1	4,1	8,8	6	1,2
5 µM	103	117,3	99	102,3	5,2	7,2	9	1,7
10 µM	88,9	86	96	67,7	1,8	9,2	4	4,5
50 µM	80	84,1	79	64,9	3,6	11,9	8	7,2

	MW				Stabw			
Sunitinib	786-O	A-498	Dibo	RC-1	786-O	A-498	Dibo	RC-1
unbehandelt	100	100	100	100	1,25	4,85	5,76	9,72
1 µM	88,4	82,14	88,62	104,67	4,77	7,44	7,53	1,57
5 µM	77,52	55,19	84,56	114,78	2,28	10,42	4,4	1,31
10 µM	70,1	66,21	75,52	107,45	3,87	7,79	1,22	4,99
Sorafenib	786-O	A-498	Dibo	RC-1	786-O	A-498	Dibo	RC-1
unbehandelt	100	100	100	100	4,37	3,36	12,1	3,53
1 µM	98,58	131,38	137	105,01	1,45	7,54	2,11	2,65
5 µM	81,22	67,98	101	46,85	10,69	8,9	5,75	6,23
10 µM	64,35	38,69	58	57,66	12,17	12,17	7,4	5,62
Pazopanib	786-O	A-498	Dibo	RC-1	786-O	A-498	Dibo	RC-1
unbehandelt	100	100	100	100	0	0	0	0
1 µM	98,84	106,4	88,14	113,22	5,61	2,18	4,97	15,64
5 µM	102,37	96,16	83,42	90,3	8,86	8,06	9,25	12,12
10 µM	103,96	92,03	77,48	85,77	1,82	5,76	4,01	7,72
50 µM	32,17	65,55	64,29	68,06	9,98	15,35	4,85	16,48

7.5 Lebenslauf

Persönliche Daten	Name: Elke Schneider Adresse: Schinkelstraße 14, 65189 Wiesbaden E-Mail: elke.schneider84@gmx.de Geburtsdatum: 03.01.1984 Geburtsort: Wiesbaden
Promotion 06/2008 - 07/2012	Untersuchung der Mechanismen der Metastasierung zur Identifikation möglicher neuer Therapieansätze beim Nierenzellkarzinom. AG Brenner, Forschungslabor der Urologie der Universitätsmedizin Mainz
	Förderung durch Wilhelm-Sander-Stiftung, MAIFOR (Mainzer Forschungsförderungsprogramm) und Inneruniversitäre Forschungsförderung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Studium 11/2003 - 05/2008	Diplomstudiengang Biologie an der Johannes Gutenberg – Universität Mainz (Note "sehr gut")
	Diplomarbeit: Mechanismen der Migrationskontrolle durch PTEN in Nierenkarzinomzellen. AG Zabel, Molekulargenetisches Labor der Kinderklinik der Universitätsmedizin Mainz
Praktika 09-10/2003 und 03-04/2004	Forschung Biologie der Bayer CropScience GmbH / Standort Frankfurt am Main
Schulabschluss 07/2003	Abitur (Note 1,9)
Schulbildung 1990-1996 1996-2003	Grundschule und Förderstufe Theißtalschule Niedernhausen Pestalozzi Gymnasium Idstein

7.6 Publikationen und Kongressbeiträge

7.6.1 Original publikationen

Schneider E, Keppler R, Prawitt D, Steinwender C, Roos FC, Thüroff JW, Lausch E, Brenner W (2011) *Migration of renal tumor cells depends on dephosphorylation of Shc by PTEN*. Int J Oncol 38: 823-31

Brenner W, Beitz S, Schneider E, Benzing F, Unger RE, Roos FC, Thüroff JW, Hampel C (2010) Adhesion of renal carcinoma cells to endothelial cells depends on PKCµ. BMC Cancer 10: 183

Brenner W, Greber I, Gudejko-Thiel J, Beitz S, **Schneider E**, Walenta S, Peters K, Unger R, Thüroff JW (2008) *Migration of renal carcinoma cells is dependent on protein kinase Cdelta via betal integrin and focal adhesion kinase*. Int J Oncol 32: 1125-31

7.6.2 Kongressebeiträge

Schneider E, Hampel C, Roos F, Thüroff JW, Brenner W: *Calcium promotes the formation of bone metastases via the calcium sensing receptor in patients with renal cell carcinoma*. AUA 107th Annual Meeting, Atlanta, USA, 19.5.-23.05.2012

Schneider E, Roos F, Prawitt D, Junker K, Hampel C, Thüroff JW, Brenner W: *Calcium induziert die Bildung von Knochenmetastasen über den CaSR und den Akt-Signalweg.* 3. Symposium Urologische Forschung der DGU, Jena, 17.-19.11.2011

Cieślikowski W, Khageh-Hosseini S, Roos F, **Schneider E**, Thüroff JW, Kwias Z, Brenner W: *Coadministration of tyrosine kinase inhibitors with rottlerin in metastatic prostate cancer*. EAU 11th Central European Meeting (CEM), Timisoara, Rumänien, 28-29.10.2011

Brenner W, **Schneider E**, Junker K, Roos F, Thüroff JW: *Calcium depending bone metastases in renal cell carcinoma*. 31st Congress of the Société Internationale D'Urologie, 16.-20.10.2011, Berlin. Urology 78 (S3A), S37, 2011

Brenner W, **Schneider E**, Junker K, Roos FC, Thüroff JW: *Calcium sensing in bone metastases of renal cell carcinoma*. 16th World Congress on Advances in Oncology and 14th International Symposium on Molecular Medicine, 06.-08.10.2011, Rhodos, Griechenland. Int J Mol Med 28 (S1), S10, 2011

Jöckel M, **Schneider E**, Khageh Hosseini S, Roos FC, Hampel C, Thüroff JW, Brenner W: *Additive effects of Sorafenib or Sunitinib with rottlerin in renal cell carcinoma (RCC) cells.* 63. Kongress der Deutsche Gesellschaft für Urologie, Hamburg, 14.-17.09.2011. Der Urologe 50 (S1): 142, 2011

Jöckel MW, **Schneider E**, Khageh-Hosseini S, Roos F, Hampel C, Thüroff JW, Brenner W: *Additive Effekte von Sorafenib und Sunitinib in Kombination mit Rottlerin beim Nierenzellkarzinom*. 2. Symposium Urologische Forschung der DGU, 11.-13.11.2010, Mainz. Publiziert in Der Urologe A, 2011

Jäger W, Becker A, **Schneider E**, Thüroff JW, Hampel C, Brenner W: *Mechanismen der spezifischen Hemmung der Migration von NZK-Zellen durch das Disintegrin Echistatin.* 2. Symposium Urologische Forschung der DGU, 11.-13.11.2010, Mainz. Publiziert in Der Urologe A, 2011

Schneider E, Prawitt D, Roos FC, Junker K, Thüroff JW, Brenner W: *Calcium als Induktor für Knochenmetastasen.* 2. Symposium Urologische Forschung der DGU, 11.-13.11.2010, Mainz. Publiziert in Der Urologe A, 2011

Brenner W, Schneider E, Keppler R, Prawitt D, Roos FC, Lausch E, Thüroff JW: *Migration of clear cell renal carcinoma cells depends on dephosphorylation of Shc by PTEN.* 62. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie, Düsseldorf, 22.-25.09.2010. Der Urologe 49 (S1): 58, 2010

Ploog S, Cieslikowski W, Jöckel M, **Schneider E**, Thüroff J.W., Brenner W: *Einfluss von Sorafenib und Sunitinib auf prozesse der Metastasierung*. 1. Symposium Urologische Forschung der DGU, 12.-14.11.2009, München. Der Urologe 49: 103, 2010

Brenner W, Schneider E, Junker K, Roos FC, Thüroff JW: *Bone metastases in renal cell carcinoma depend on calcium sensing.* 19. Meeting of the ESUR, Vilnius, Lithauen, 7.-9.10.2010

Brenner W, **Schneider E**, Prawitt D, Roos FC, Lausch E, Thüroff JW: *The tumorsuppressor PTEN influences metastases of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) by dephosphorylation of Shc*. AUA 105th Annual Meeting, San Francisco, USA, 29.5.-03.06.2010; J. Urol 183: 144, 2010

Jäger WJ, Becker A, Schneider E, Thüroff JW, Hampel C, Brenner W: *The importance of desintegrins and peptides with the aminoacid sequence RGD for the migration and adhesion of renal cell cancer (RCC) cells.* 61. Kongress der Deutsche Gesellschaft für Urologie, Dresden, 16.-19.09.2009. Der Urologe 48 (S1): 69, 2009

Brenner W, **Schneider E**, Lausch E, Roos F, Thüroff JW: *The protein phosphatase and the PDZ binding domain of the tumor suppressor PTEN regulate migration of renal cancer cells.* 61. Kongress der Deutsche Gesellschaft für Urologie, Dresden, 16.-19.09.2009. Der Urologe 48 (S1): 70, 2009

Brenner W, Schneider E, Lausch E, Roos FC, Thüroff JW: *Role of PTEN phosphatase activity in migration of renal cancer cells*. AUA 104th Annual Meeting, Chicago, USA, 25.-30.05.2009; J. Urol 181: 35, 2009

Schneider E, Lausch E, Roos FC, Thüroff JW, Brenner W: *Role of different PTEN activities in regulation of migration of renal cancer cells.* 9th International congress of young medical scientists, Posen 17.-19.05.2009

Brenner W, Schneider E, Lausch E, Roos FC, Thüroff JW: Dependance of PTEN phosphatase activity in migration of renal cancer cells. AACR 100th Annual Meeting, Denver, USA, 18.-22.04.2009. Cancer Res 50: 1379, 2009

Schneider E, Lausch E, Roos F, Thüroff JW, Brenner W: *The protein phosphatase and the PDZ binding domain of the tumor suppressor PTEN regulate migration of renal cancer cells.* 1st Joint Meeting of Swiss and German Society of Cell Biology, Konstanz 24.-27.03.2009. Eur J Cell Biol 88S1: 80, 2009

Brenner W, Jäger W, Becker A, **Schneider E**, Thüroff JW: *Molecular mechanisms of the inhibitory effect of tumor cell migration by disintegrins*. 1th Joint Meeting of Swiss and German Society of Cell Biology, Konstanz 24.-27.03.2009. Eur J Cell Biol 88S1: 68, 2009

7.7 Danksagung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Wiesbaden, den 14.08.2012

Elke Schneider