

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Einfluss des Calcium-sensitiven Rezeptors auf die Expression von miRNA im Hinblick auf eine Knochenmetastasierung des Nierenzellkarzinoms

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Sylvia Sabine Weis aus Heilbronn

Mainz, 2017

Dekan:

1. Berichterstatterin:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Dezember 2017

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZIELSETZUNG	1
2	LITERATURDISKUSSION.....	3
2.1	NIERENZELLKARZINOM.....	3
2.1.1	Epidemiologie.....	3
2.1.2	Mortalität.....	4
2.1.3	Ätiologie und Risikofaktoren	4
2.1.4	Klinische und Histopathologische Klassifikation.....	5
2.1.5	Symptomatik und Diagnose	7
2.1.6	Therapie.....	8
2.1.7	Prognose	12
2.2	METASTASIERUNG.....	12
2.2.1	Molekulare Grundlagen.....	13
2.2.2	Organspezifische Metastasierung.....	16
2.2.3	Knochenspezifische Metastasierung	17
2.3	DER CALCIUM-SENSITIVE REZEPTOR (CASR)	19
2.3.1	Die Rolle des CaSR und Calciums in der Knochenmetastasierung.....	20
2.3.2	Regulatoren des CaSR.....	22
2.4	MICRO-RNA (MIRNA)	23
2.4.1	Expression von miRNA.....	23
2.4.2	miRNA im Nierenzellkarzinom und in dessen knochenspezifischer Metastasierung.....	25
3	MATERIAL UND METHODEN.....	27
3.1	MATERIALIEN.....	27
3.1.1	Geräte.....	27
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	27
3.1.3	Gebrauchsmaterialien.....	28
3.1.4	Chemikalien	28
3.1.5	Puffer und Lösungen	29
3.1.6	Kits.....	29
3.1.7	Transfektionsreagenzien	30
3.1.8	Oligonukleotide.....	30
3.1.9	Transfektionsreagenzien	30

3.1.10 Zelllinien.....	31
3.2 ZELBIOLOGISCHE METHODEN	31
3.2.1 Steriles Arbeiten	31
3.2.2 Zellkultivierung.....	32
3.2.3 Zellzahlbestimmung	32
3.2.4 Konservierung und Auftauen humaner Zelllinien	33
3.2.5 Behandlung der Zellen mit Calcium	33
3.2.6 Behandlung der Zellen mit NPS2143 zur Hemmung des CaSR.....	34
3.2.7 Transfektion der Zellen mit miRNA 23a-Inhibitor.....	34
3.2.8 Zellviabilitätsmessung mit Hilfe des GloMAX-Assays	36
3.2.9 Zellproliferationsmessung mit Hilfe des BrdU-Assays	
(Bromdesoxyuridin-Inkorporation).....	36
3.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	38
3.3.1 Extraktion der Gesamt-RNA	38
3.3.2 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren mit Hilfe	
des NanoDrop.....	39
3.3.3 miRNA-Expressionsanalyse	40
3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	41
3.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG	51
4 ERGEBNISSE	52
4.1 miRNA-EXPRESSIONSANALYSE MIT HILFE DES miRNA MICROARRAY	52
4.2 VALIDIERUNG DER SCREENING-ERGEBNISSE DURCH PCR-QUANTIFIZIERUNG.....	56
4.2.1 Auswahl der Standard-miRNA RNU49 und RNU6	56
4.2.2 Die Expression der miRNA 23a in Abhängigkeit des CaSR	57
4.2.3 Die Expression der miRNA 374b in Abhängigkeit des CaSR.....	58
4.2.4 Die Expression der miRNA 181c in Abhängigkeit des CaSR	59
4.2.5 Die Expression der miRNA 320c in Abhängigkeit des CaSR	59
4.2.6 Die Expression der miRNA 424 in Abhängigkeit des CaSR	60
4.3 DAS EXPRESSIONSVERHALTEN DER miRNA 23A NACH HEMMUNG DES CASR.....	61
4.4 ETABLIERUNG DER TRANSFEKTION VON CASR-ZELLEN MIT DEM	
miRNA 23A-INHIBITOR	63
4.5 EINFLUSS DER miRNA 23A UND DES CASR AUF ZELLULÄRE PROZESSE	64
4.5.1 Einfluss auf die Zellviabilität.....	65
4.5.2 Einfluss auf die Toxizität.....	69

4.5.3	Einfluss auf die Proliferation	71
5	DISKUSSION.....	74
5.1	DIE miRNA 23A	74
5.2	miRNA 23A UNTERSÜTZT DIE KNOCHENMETASTASIERUNG	76
5.3	DIE miRNA 374B.....	79
5.4	DIE miRNA 181C.....	81
5.5	DIE miRNA 320C.....	82
5.6	DIE miRNA 424.....	84
5.7	METHODENKRITIK.....	85
5.8	AUSBLICK	87
6	ZUSAMMENFASSUNG	89
7	LITERATURVERZEICHNIS	91
8	ANHANG.....	102
8.1	TABELLENVERZEICHNIS.....	102
8.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	103
8.3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	104
8.4	WERTE ZU DEN ABBILDUNGEN	107
8.5	DANKSAGUNG	113
8.6	LEBENS LAUF	114

1 ZIELSETZUNG

Die Erstbeschreibung der miRNA 1993 im Nematoden *Caenorhabditis elegans* durch Lee *et al.* war die Geburtsstunde eines neuen und weitreichenden Forschungsgebietes [1]. Insbesondere als wenige Jahre später miRNA-Expressionen auch in humanen Zellen nachgewiesen wurden und die ersten biochemischen und genetischen Untersuchungen allmählich physiologische Funktionen der miRNA aufdeckten, trugen immer mehr Forschungsgruppen dazu bei, das Ausmaß der miRNA-Bedeutung für die Zellregulation zu begreifen [2]. Durch die Erkenntnis, dass miRNA in Zellzyklusabläufe, wie die Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose eingreifen und Fehlregulationen weitreichende Konsequenzen für Zellentartungen haben können, wurden in den letzten Jahren zunehmend die Zusammenhänge von miRNA mit Pathologien wie z.B. Krebserkrankungen oder Metastasierungsprozessen untersucht. In vielen Krebsarten wurden dysregulierte miRNA-Expressionen und die Eigenschaft der miRNA, als Tumorsuppressor oder Onkogen in die Signalwege der Zelle einzugreifen, nachgewiesen [3]. Diese bereits vielversprechenden Erkenntnisse führen zu der Annahme, dass miRNA das Potential als diagnostische Biomarker oder potente therapeutische Targets im Kampf gegen Krebserkrankungen haben könnten.

Insbesondere beim Nierenzellkarzinom (NZK) spielt diese Option eine große Rolle. Sobald das NZK Metastasen ausgebildet hat, verschlechtert sich die Prognose für den Patienten drastisch und die Mortalität steigt rapide [4]. 90 % aller Tumorpatienten sterben an den Folgen einer Metastasierung [5]. Die momentan verfügbaren Substanzen zur zielgerichteten Therapie beim metastasierten NZK stellen zwar eine enorme Weiterentwicklung bezüglich des progressionsfreien Überlebens gegenüber der früher üblichen Zytokintherapie dar, jedoch kann damit auch weiterhin nur ein palliatives Therapiekonzept verfolgt werden und die Prognose bleibt mit einem durchschnittlichen Gesamtüberleben von 29 Monaten schlecht [6-8]. Aus diesem Grund stellt die Erforschung der grundlegenden Veränderungen zellulärer Prozesse und Signalwege des

Metastasierungsprozesses beim NZK eine besondere Herausforderung dar, um neue Therapieoptionen entwickeln oder bestehende Therapien optimieren zu können.

Ein Hauptmetastasierungsort des NZK ist der Knochen: 30 % aller NZK bilden Knochenmetastasen aus [9]. Unsere Arbeitsgruppe lieferte einen wichtigen Beitrag zum Verständnis dieses Metastasierungsprozesses. Es konnte gezeigt werden, dass der Calcium-sensitive Rezeptor (CaSR) eine entscheidende Rolle bei den zellulären Mechanismen während der Knochenmetastasierung spielt [10-12]. Er führt zu einer verstärkten Proliferations- und Migrationsneigung der NZK-Zellen in das Calcium-reiche Milieu der Knochen und zu stärkeren adhäsiven Eigenschaften. Eine Beteiligung bestimmter miRNA bei der knochenspezifischen Metastasierung des NZK konnte bereits von Heinzelmann *et al.* gezeigt werden [13].

Aus diesen bisherigen Erkenntnissen ergab sich für die vorliegende Arbeit die Fragestellung, ob der CaSR einen Einfluss auf die Expression bestimmter miRNA hat und diese bei zellulären Signalwegen des knochenspezifischen Metastasierungsprozesses involviert sind. Deshalb sollten verändert exprimierte miRNA in CaSR-überexprimierenden NZK-Zellen identifiziert und der regulatorische Zusammenhang zum CaSR untersucht werden. Weiterhin stellte sich die Frage, ob die identifizierten CaSR-abhängigen miRNA für metastasierungsfördernde Eigenschaften, wie z.B. die Zellproliferation und Zellviabilität, verantwortlich sind.

Eine Beteiligung von miRNA an den zellulären Funktionen des CaSR bei der Knochenmetastasierung könnte ein weiterer Schritt in der Aufklärung einer Signalkette sein und weitreichende Konsequenzen für Diagnostik, Screening oder Therapieoptionen des knochenmetastasierten Nierenzellkarzinoms haben.

2 LITERATURDISKUSSION

2.1 NIERENZELLKARZINOM

2.1.1 EPIDEMIOLOGIE

Das Nierenzellkarzinom (NZK) macht über 90 % aller malignen Erkrankungen der Niere aus und ist die dritthäufigste unter den urologischen Tumorerkrankungen [14]. Im Jahr 2012 verzeichnete das Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts die Neuerkrankung von 5 530 Frauen und 9 500 Männern an einem NZK in Deutschland, während die weltweite Inzidenz etwa 340 000 betrug [15, 16]. Männer sind häufiger betroffen als Frauen. Mit 3,8 % ist das Nierenzellkarzinom der 6.-häufigste neu diagnostizierte Tumor beim Mann und mit 2,4 % der 10.-häufigste bei der Frau (Abbildung 1). Das Erkrankungsrisiko steigt ab dem 35. Lebensjahr stetig, wobei das mittlere Erkrankungsalter für Männer bei 68 Jahren und für Frauen bei 71 Jahren liegt [15]. Seit Ende der 90-er Jahre wird eine jährliche Steigerung an Neuerkrankungen um etwa 2 % beobachtet [17]. Es konnte eine erhöhte Gefährdung von Menschen in Industrienationen - wie Nord- und Osteuropa, Nordamerika und Australien - gegenüber beispielsweise Menschen in Asien oder Afrika beobachtet werden. [16].

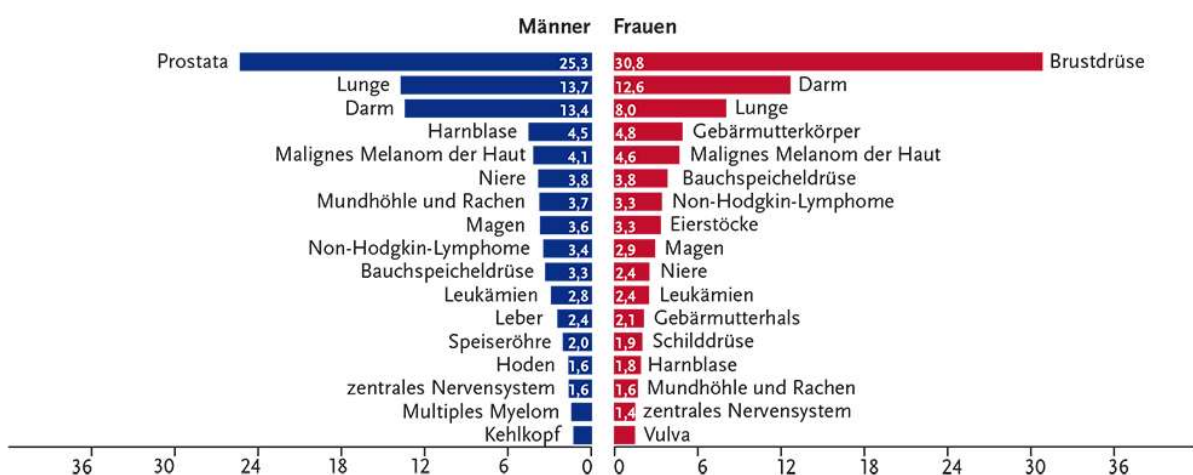


Abbildung 1. Krebserkrankungen nach prozentualer Häufigkeit in Deutschland bei Frauen und Männern (Angabe in %). Das NZK stellt bei Männern mit 3,8 % die sechsthäufigste und bei Frauen mit 2,4 % die zehnthäufigste Tumorerkrankung dar [15].

2.1.2 MORTALITÄT

Die absoluten Mortalitätsraten stiegen in Europa seit den 1990er Jahren und stabilisierten sich seitdem, wohingegen die altersstandardisierten Sterberaten seit 1998 sogar rückläufig sind. Dies könnte mit der Diagnosestellung in zunehmend früheren Stadien zusammenhängen. Bei Männern werden 2,6 %, bei Frauen 2,1 % aller Krebssterbefälle durch das NZK verursacht [15].

2.1.3 ÄTIOLOGIE UND RISIKOFAKTOREN

Der überwiegende Anteil der Erkrankungsfälle wird mit Risikofaktoren wie Rauchen, Übergewicht und erhöhtem Blutdruck in Zusammenhang gebracht [4, 18-21]. Aber auch Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz und langjähriger Dialyse oder der Exposition gegenüber halogenierten Kohlenwasserstoffen, Cadmium oder Blei sind stärker gefährdet, ein Nierenzellkarzinom zu entwickeln [17, 22-25]. 2-3 % der Erkrankungsfälle beruhen jedoch auf einer genetischen Prädisposition. Zu den hereditären Syndromen, die ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines NZK mit sich führen, zählen das Birt-Hogg-Dubé-Syndrom, die tuberöse Sklerose, die hereditäre Leiomyomatose, das hereditäre papilläre Nierenzellkarzinom und das van-Hippel-Lindau- (VHL-) Syndrom, wovon letzteres die häufigste Form des hereditären NZK darstellt [14, 17, 26]. Das van-Hippel-Lindau-Syndrom zählt zu den neurokutanen Syndromen und folgt einem autosomal-dominanten Erbgang. Es wird durch eine Mutation eines Allels des VHL-Gens auf Chromosom 3p²⁵⁻²⁶ hervorgerufen [17]. Fokale Läsionen, wie beispielsweise das NZK, resultieren dann aus der Inaktivierung oder dem *Silencing* des zweiten Allels. Das Risiko, bis zum Alter von 60 Jahren an einem NZK zu erkranken, liegt für Genträger bei über 70 % [27]. Unter natürlichen Bedingungen hat das VHL-Gen die Rolle eines Tumorsuppressors. Nierenzellkarzinome, die sich im Rahmen des VHL-Syndroms manifestieren, treten häufig schon im frühen Erwachsenenalter auf und sind histologisch vom klarzelligen Typ. Charakteristisch für die klinische Erscheinung ist das zusätzliche Auftreten weiterer Manifestationen wie Angiome der Retina und des Zentralnervensystems sowie Phäochromozytome [28]. Bei 60-80 % aller

Patienten mit einer sporadisch erworbenen Form des klarzelligem NZK (kNZK) konnte jedoch ebenfalls eine Mutation im VHL-Gen nachgewiesen werden [29, 30].

2.1.4 KLINISCHE UND HISTOPATHOLOGISCHE KLASSIFIKATION

Das NZK wird klinisch nach der durch die *Union Internationale contre le Cancer* (UICC) und das *American Joint Committee on Cancer* aufgestellten TNM-Klassifikation eingeteilt. Diese berücksichtigt die Tumorgöße (T) und das Vorhandensein eines Lymphknotenbefalls (N) oder von Metastasen (M) (Abbildung 2). Die aktuelle Klassifikation enthält die zuletzt 2010 vorgenommenen Ergänzungen [31]. Durch die Tumorgade G1-G3 werden die morphologischen Veränderungen der Zelle und des Zellkerns beschrieben [14]. Die Hauptmetastasierungsorte des NZK sind die Lunge, die Knochen, das Gehirn und die Leber [9].

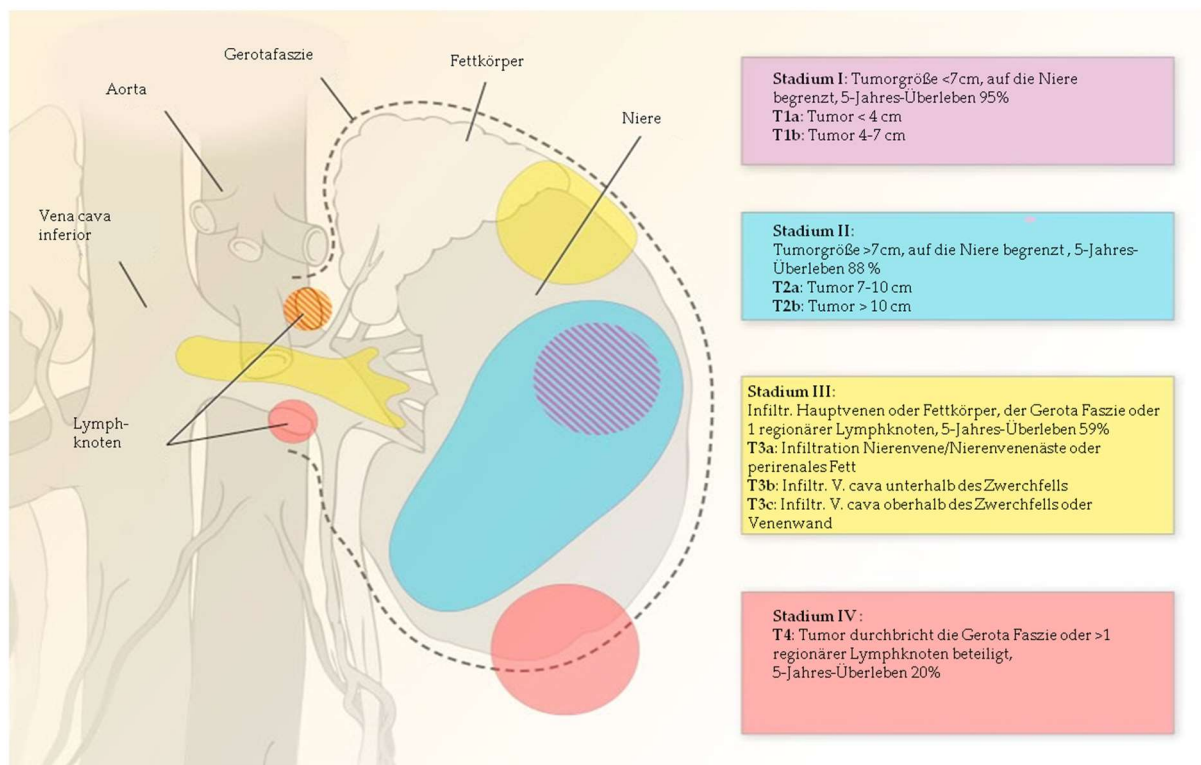


Abbildung 2. Tumorstadien des Nierenzellkarzinoms. Modifiziert nach [17].

Das NZK lässt sich in verschiedene histopathologische Sybtypen einteilen, die vom Epithel unterschiedlicher Nephronabschnitte ausgehen (Tabelle 1) [32]. Die häufigsten Subtypen sind das klarzellige NZK mit 75-80 %, gefolgt vom papillären NZK mit 10-15 % und dem chromophoben NZK mit 5 %. Den Rest machen seltenere Formen

wie z.B. das Ductus-Bellini-(Sammelrohr)-Karzinom aus. Sowohl das klarzellige NZK, als auch das papilläre NZK gehen vom Epithel des proximalen Tubulus aus, während das chromophobe und das Sammelrohrkarzinom im distalen Tubulus bzw. Sammelrohr entstehen [32]. Das klarzellige NZK, welches in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, tritt zu mehr als 96 % sporadisch auf und ist zu einem geringen Anteil genetisch bedingt (< 4 %) (Abschnitt 2.1.3) [33]. Es ist durch hellzellige, blass gefärbte Zellen mit vakuolisiertem Zytoplasma und einem hohen Lipid- und Glykogenanteil charakterisiert. Oft finden sich auch granulare Zellen mit eosinophilem Zytoplasma [34]. 2004 wurde von der *World Health Organisation* (WHO) eine histopathologische Klassifikation der Nierenzellkarzinome erstellt, die 2013 durch die Internationale Gesellschaft für urologische Pathologie (ISUP) in der Vancouver-Klassifikation neu ausgearbeitet und ergänzt wurde. Dabei wurden morphologische und genetische Gesichtspunkte sowie bis dahin neu identifizierte Tumorentitäten berücksichtigt [35]. 2016 erstellte die WHO darauf basierend eine neue Klassifikation, die aktuell die Grundlage der NZK-Einordnung bildet (Tabelle 1).

Tabelle 1. ISUP-Vancouver-Klassifikation von Nierenzellkarzinomen nach aktuellen Ergänzungen der WHO 2016 [27, 34].

Bezeichnung des Subtyps	Häufigkeit
Papilläres Adenom (gutartiger Tumor)	7-20 %
Onkozytom (gutartiger Tumor)	5 %
Klarzelliges Nierenzellkarzinom <ul style="list-style-type: none"> ▪ Multilokulär zystisches Nierenzellkarzinom von niedrig malignem Potential 	75-80 %
Papilläres Nierenzellkarzinom	10-15 %
Chromophobes Nierenzellkarzinom	5 %
Ductus-Bellini-Karzinom (Sammelrohrkarzinom)	< 1 %
Medulläres Nierenzellkarzinom	< 1 %
Translokationstumoren der MiT-Familie <ul style="list-style-type: none"> ▪ Xp11.2-Translokations-Nierenzellkarzinom ▪ t(6;11)-Nierenzellkarzinom 	selten
Neuroblastomassoziierte Nierenzellkarzinome	selten
Muzinöses, tubuläres und spindelzelliges Karzinom	< 1 %
Tubulozystisches Nierenzellkarzinom	selten
Mit erworbener zystischer Erkrankung assoziiertes Nierenzellkarzinom	selten
Hellzelliges (tubulo)papilläres Nierenzellkarzinom	selten
Mit hereditärer Leiomyomatose assoziiertes Nierenzellkarzinom	selten
Unklassifiziertes Nierenzellkarzinom	4-7 %

2.1.5 SYMPTOMATIK UND DIAGNOSE

Die klassische Symptomtrias des NZK besteht aus Flankenschmerz, Makrohämaturie und einem tastbaren Tumor. Auch Pyelonephritiden können ein Hinweis sein. Jedoch zeigt sich diese Symptomatik meist erst in einem weit fortgeschrittenen Stadium, da die Erkrankung in der Regel lange Zeit asymptomatisch verläuft [17]. In den letzten Jahren wurden über 50 % der Nierenzellkarzinome als Zufallsbefund bei abdominalen Bildgebungen aufgrund anderer Indikationen entdeckt. Wie bei anderen Tumorerkrankungen können außerdem unspezifische Allgemeinsymptome, wie Abgeschlagenheit, Fieber unklarer Genese, Nachtschweiß und ungewollter Gewichtsverlust (B-Symptomatik), hinzukommen [34]. Zur Früherkennung von Nierentumoren eignet sich als nicht-invasive, strahlenfreie und schnelle Methode die Sonographie [14]. Bei pathologischen Auffälligkeiten dient eine weitere Bildgebung durch CT oder MRT der näheren Klassifikation. Die Staging-Diagnostik vor der operativen Therapie des NZK erfolgt zur Einschätzung der Tumorausdehnung und der Frage nach Metastasen [27]. Diese beinhaltet neben der Anamnese und der körperlichen Untersuchung ein Routinelabor (insbesondere Hämatokrit, Kreatininwert, Calciumionen, alkalische Phosphatase) sowie die Urinanalyse. Dazu erfolgt eine bildgebende Diagnostik zur lokalen Resektionsplanung mittels nativem CT (von der Leberkuppe bis zur Symphyse). Dabei wird außerdem eine früharterielle Phase (Nieren bis Beckeneingang) zur Identifizierung kleiner multifokaler Herde oder Metastasen und eine venöse Phase (Leberkuppe bis Symphyse) zum Erkennen der venösen Tumorausdehnung oder Lymphknoten gemessen [27]. Bei Patienten mit Verdacht auf eine Venen- oder Cava-Beteiligung sollte ein MRT durchgeführt werden. Das CT hat sich zur Einschätzung kleiner Tumoren bewährt, während die Tumorausdehnung bei Verdacht auf Cavazapfen mit der MRT besser beurteilt werden kann [36].

2.1.6 THERAPIE

2.1.6.1 OPERATIVE THERAPIE

Die operative Therapie stellt bisher die einzige Behandlung mit kurativer Intention dar [14]. Dabei ging die Entwicklung in den letzten Jahren zunehmend in Richtung der *nephron-sparing* Chirurgie, wobei trotz der notwendigen Radikalität versucht wird, möglichst viel des gesunden Nierenparenchyms zu erhalten [37]. Radikale und partielle Nephrektomie können beide sowohl endoskopisch als auch offen durchgeführt werden. Außerdem kamen in den letzten zehn Jahren zunehmend roboterassistierte Techniken zum Einsatz. Allerdings ist die Datenlage bzw. Datenqualität bezüglich der Vergleichbarkeit zur laparoskopischen Nephrektomie noch nicht ausreichend. Aktuell setzt die EAU-Leitlinie die robotische Operation der laparoskopischen bei ausreichender Erfahrung des Operateurs gleich [38]. Die laparoskopische Nephrektomie wird, wenn technisch möglich, gegenüber der offenen Nephrektomie empfohlen.

Für T1- und T2-Tumoren stellt die partielle parenchymsparende Nephrektomie die Methode der Wahl dar, während bei T3- und T4-Tumoren die offene radikale Nephrektomie als Standard gilt und die laparoskopische Operation in Erwägung gezogen werden kann [39]. Einen Überblick über die empfohlene Vorgehensweise der operativen Therapie des NZK gibt Tabelle 2. Von einer Adrenalektomie oder Lymphadenektomie wird in den Leitlinien abgeraten, solange CT-graphisch kein Anhalt für einen Tumorbefall besteht. Bei Patienten mit einem stark erhöhten Operationsrisiko und kleinen kortikalen Tumoren (< 3 cm) können Radiofrequenz- oder Kryoablationen eine Option darstellen. Hierbei sollte im Vorfeld jedoch eine Tumorbiopsie erfolgen [39]. Aktuell ergibt sich aus den Ergebnissen randomisierter Phase-III-Studien keine Evidenz für einen Überlebensvorteil durch eine adjuvante Therapie beim lokalisierten NZK [37].

Tabelle 2. Therapiealgorithmus für die operative Versorgung des NZK (modifiziert nach [14])

Tumorstadium	Operation	Durchführung	Empfehlung
T1a	Partielle Nephrektomie	Offen	Optional
		Laparoskopisch	Standard für Zentren mit großer laparoskopischer Erfahrung
	Radikale Nephrektomie		Für ausgewählte Patienten
T1b-T2	Radikale Nephrektomie	Offen	Optional
		Laparoskopisch	Goldstandard
	Partielle Nephrektomie		Für ausgewählte Patienten
T3, T4	Radikale Nephrektomie	Offen	Goldstandard
		Laparoskopisch	Für ausgewählte Patienten

Beim metastasierten NZK ist nur in seltenen Fällen eine kurativ intendierte Operation möglich. Voraussetzung dafür ist eine vollständige Resektion des Tumors und zusätzlich eine Metastasektomie. In den meisten Fällen kann im metastasierten Stadium nur eine zytoreduktive radikale Nephrektomie in palliativer Absicht durchgeführt werden [37]. Das Ziel dabei ist, die Tumormasse zu reduzieren, um assoziierte Symptome zu lindern und eine Induktion von Spontanremissionen zu begünstigen [14]. Im Anschluss erfolgt eine systemische Immuntherapie, um das Tumorwachstum zu verzögern (Abschnitt 2.1.6.2).

2.1.6.2 MEDIKAMENTÖSE THERAPIE

NZK weisen eine hohe Strahlen- und Chemoresistenz auf. Dies wird unter anderem auf die Überexpression des *Multi-Drug-Resistance* assoziierten P-Glykoproteins zurückgeführt. Es wird aus den Zellen des proximalen Tubulus freigesetzt, was insbesondere für das klarzellige NZK und das papilläre NZK eine Rolle spielt [17]. Aus diesem Grund sind alternative Therapieprinzipien des metastasierten NZK notwendig. Jahrelang galt die Immunchemotherapie unter Einbeziehung von Interferon- α (Inf- α), Interleukin-2 und 5-Fluoruracil (5-FU) als Standardtherapie. Jedoch wurde darunter nur eine geringe Wirksamkeit mit hoher Nebenwirkungsrate beobachtet [40-42]. Seit 2006 kam es jedoch zur Zulassung mehrerer zielgerichteter Substanzen (*targeted therapy*), die in die Signaltransduktion der Tumorzellen hemmend eingreifen. Darunter wurde eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens und eine deutlich geringere Nebenwirkungsrate beobachtet [43, 44]. Zur Verfügung stehende Substanzen sind

Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) (Sorafenib, Sunitinib, Pazopanib, Cabazantinib und Axitinib), Inhibitoren des *mammalian target of rapamycin* (mTOR) (Temsirolimus und Everolimus) und der monoklonale VEGF-Antikörper Bevacizumab in Kombination mit Inf- α [45, 46].

Die Substanzen für eine *targeted therapy*, sogenannte *smart drugs*, greifen in zwei unterschiedliche Signalwege hemmend ein. Ein Mechanismus ist die Hemmung der Angiogenese. Im sporadischen kNZK führt eine VHL-Inaktivierung zur erhöhten HIF-Expression, wodurch wiederum *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *platelet derived growth factor* (PDGF) freigesetzt werden und die Angiogenese angeregt wird [29]. In diesen Prozess greifen TKI und der VEGF-Antikörper Bevacizumab ein [37]. Die meisten Studien wurden am kNZK durchgeführt, weshalb für andere NZK-Subtypen keine ausreichende Evidenz der Substanzen vorliegt [47]. Der zweite Mechanismus greift in den mTOR-Signalweg ein; mTOR ist an der Signaltransduktion der Zellproliferation und Angiogenese beteiligt [43]. mTOR-Inhibitoren, wie Temsirolimus und Everolimus, bilden einen Komplex mit mTOR und hemmen dessen Wirkung. In der Drittlinien-Therapie kommt weiterhin Nivolumab zum Einsatz [48]. Dabei handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der als Immun-*checkpoint*-Inhibitor das *programmed cell death protein 1* (PD1) hemmt. Tumorzellen entkommen dem Immunsystem, indem sie sich sogenannter Immun-*checkpoints* bedienen, um vom Immunsystem nicht mehr erkannt zu werden. Nivolumab greift in diesen Tumorzellmechanismus ein und stärkt die Immunreaktion gegen den Tumor. Das Medikament ist seit 2016 in Deutschland zugelassen [49, 50].

Die Leitlinien empfehlen den Einsatz der *smart drugs* als sequentielle Therapie, da NZK oft innerhalb von 1,5 Jahren Resistenzen entwickeln [51]. Bei einem eindeutigen Progress oder untolerierbaren Nebenwirkungen sollte zu einem nächsten Präparat übergegangen werden [37]. Ein Therapiealgorithmus für die Anwendung von *smart drugs* ist in Abbildung 3 veranschaulicht. Zur Therapieplanung sollte zunächst die Prognose eingeschätzt werden. Hierfür eignen sich das Tumor-Staging und das *University of California Los Angeles Integrated Staging System* (UISS) oder der *stage, size, grade and*

necrosis score (SSGIN) [39]. Zur Zeit der Immuntherapie entstanden die Motzer-Kriterien, die nun aktualisiert wurden und als sogenannte Heng-Kriterien ebenfalls zur Anwendung vor einer zielgerichteten Therapie kommen [52, 53]. Sie berücksichtigen den Karnofsky-Index, den Hämoglobinwert, die Zeitdauer zwischen Diagnose und Therapiebeginn, den Ca^{2+} -Wert, die Thrombozytenanzahl und die Anzahl neutrophiler Granulozyten [27].

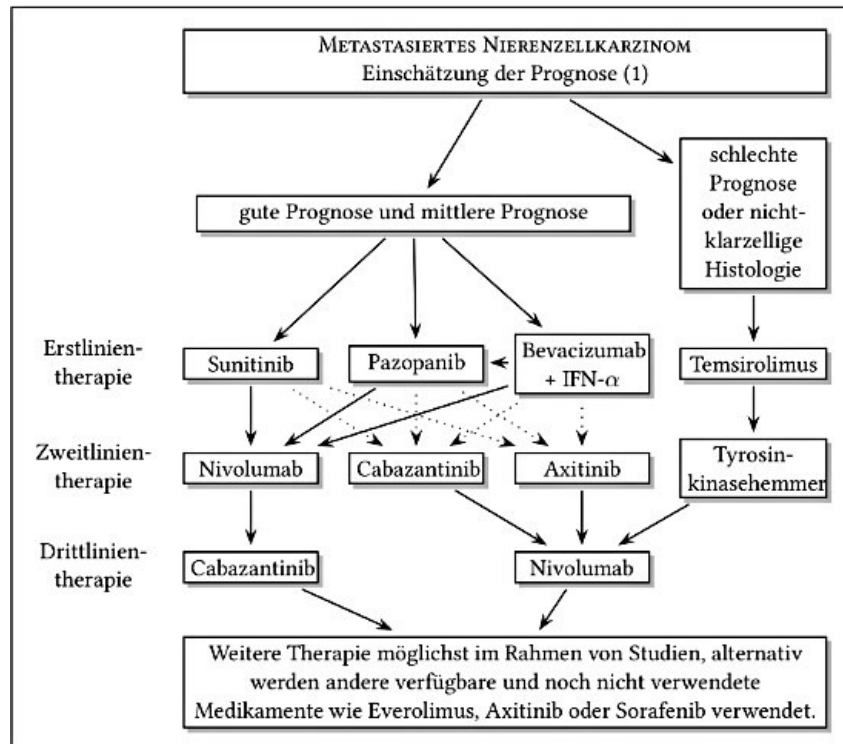


Abbildung 3. Mögliche sequenzielle Therapie des metastasierten NZK mit *smart drugs* [34]. Die Prognose kann beispielsweise mit Hilfe der aktualisierten Motzer-Kriterien eingeschätzt werden.

2.1.6.3 WEITERE THERAPIEOPTIONEN

Unter bestimmten Umständen kann bei kleinen Nierentumoren (< 4 cm) eine aktive Überwachung des Tumors in Erwägung gezogen werden. Selektionskriterien sind ein erhöhtes Patientenalter, eine verkürzte Lebenserwartung oder eine hohe Komorbidität mit hohem OP-Risiko sowie der ausdrückliche Patientenwunsch. Abgegrenzt werden muss dieses Konzept jedoch von der kurativ intendierten und leitliniengerechten Therapieoption der aktiven Überwachung beim Prostatakarzinom. Hier stehen der PSA-Verlauf, der Gleason-Score und die Möglichkeit von Verlaufsbiopsien sowie eine große Datenlage zur Verfügung. Vergleichbare Parameter existieren beim NZK jedoch

nicht, so dass nur anhand der Bildgebung eine Einschätzung getroffen werden kann [27]. Essentiell für die palliative Therapie des metastasierten NZK ist weiterhin das Lindern der Begleitsymptomatik, wie z.B. Tumorschmerzen, Tumorblutungen, Elektrolytentgleisungen (Hypercalcämie) oder Symptome, die z.B. durch Knochen- oder Gehirnetastasen auftreten. Eine Optimierung der Schmerztherapie ist unerlässlich [34].

2.1.7 PROGNOSE

Die Prognose des lokalisierten NZK ist vergleichsweise günstig. Etwa 75 % der Erkrankungen werden in Stadium T1 oder T2 diagnostiziert, die nach operativer Therapie eine 5 Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit von 65-75 % zeigen [14, 54]. Jedoch stellt ein entscheidender prognostischer Faktor das zugrunde liegende Tumorstadium dar. 25-30 % der NZK sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits metastasiert [55]. Weitere 20-40 % entwickeln im weiteren Verlauf nach Nephrektomie Metastasen [56]. In diesem Stadium der Erkrankung liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 14 % [57].

2.2 METASTASIERUNG

Metastasierung bedeutet die Disseminierung und Ansiedelung maligner Zellen eines Primärtumors in ein Sekundärorgan. Primärtumoren bestehen aus heterogenen Zellpopulationen mit genetischen Variationen, die ihnen in unterschiedlichem Maß das Durchbrechen physikalischer Grenzen sowie die lymphogene oder hämatogene Disseminierung und die Kolonisation in entfernten Körperkompartimenten ermöglichen [58]. Durch intrinsische genomische Instabilität der Tumorzellen und einen Selektionsdruck im Primärgewebe können sich Strukturveränderungen der Tumorzellen vollziehen, die mit einem gesteigerten Metastasierungspotential einhergehen. Bei der Ausbildung von Metastasen verschlechtern sich die Heilungschancen einer Tumorerkrankung drastisch und die Mortalität steigt rapide. 90 % aller Tumorpazienten sterben an den Folgen einer Metastasierung [5]. Trotz der schnellen Entwicklung neuer Tumorthera-pien, bleibt auch heute für metastasierte Krebsleiden in den meisten Fällen nur noch die Option der palliativen Behandlung.

2.2.1 MOLEKULARE GRUNDLAGEN

Die Ausbildung von Metastasen vollzieht sich in mehreren komplexen Schritten, die als *multistep*-Prozess der Metastasierung (Abbildung 4) bezeichnet werden [59, 60]. Für eine erfolgreiche Metastasierung müssen sich Tumorzellen aus dem Primärtumor lösen, über das Blut- oder Lymphsystem in ein Sekundärgewebe transportiert werden, sich dort ansiedeln und kolonisieren. Dabei beruht jeder Schritt auf den phänotypischen Eigenschaften der Tumorzellen, den Interaktionen mit der Mikroumgebung des Zielgewebes und dem Immunsystem [61]. Jedoch werden nur 0,01 % aller migrierten Tumorzellen, die in das Blutgefäßsystem eingedrungen sind, zu Metastasen, denn die meisten Tumorzellen scheitern innerhalb des komplexen *multistep*-Prozesses und werden eliminiert [59].

Im ersten Schritt der Metastasierung kommt es zunächst zur Dissoziation der Tumorzellen aus dem Zellverband, um in umliegendes Gewebe eindringen zu können. Hierfür müssen interzelluläre Adhäsionsstrukturen aufgebrochen werden, was durch die Veränderung von Oberflächenmolekülen erfolgt. Im Vergleich zu gesundem Gewebe zeigen Tumorzellen in der Regel bereits verringerte Zelladhäsionen auf [62]. Dies ist auf den Verlust von Zell-Adhäsions-Molekülen, wie z.B. Integrinen, *immunoglobulin-like-cell-adhesion-molecules* (Ig-CAM), Selektinen und besonders E-Cadherinen, zurückzuführen [63, 64]. In den meisten Tumoren epithelialen Ursprungs konnte beispielsweise eine Konkordanz des E-Cadherin-Verlustes mit einer zunehmenden Malignität beobachtet werden [63]. Die dysregulierten Adhäsionsproteine führen somit zum leichteren Loslösen der Tumorzellen aus dem Zellverband und einer erhöhten Invasivität des Tumors [65, 66]. Anschließend folgt die Invasion der Tumorzellen in das umliegende Stroma. Sie müssen in der Lage sein, sich im umliegenden Gewebe frei zu bewegen und zu verteilen. Dabei werden Signalwege aktiviert, die zur Veränderung des Zytoskeletts der Tumorzellen und zu deren Formänderung führen damit sie das Stroma passieren können [59, 67].

Die Intravasation stellt den nächsten Schritt der Metastasierung dar. Dabei migrieren die Zellen durch die Basalmembran der Blut- oder Lymphgefäße und treten somit in die

Blutzirkulation oder das Lymphsystem ein, wodurch sie in entfernte Organe transportiert werden können. Eine Charakteristik wachsender Primärtumoren ist die Ausbildung einer eigenen Blutversorgung. Durch die neu gebildeten Blutgefäße haben Tumorzellen einen direkteren Anschluss an das Blutgefäßsystem [68, 69]. Die Migration durch die Basalmembran wird durch die Sekretion von Proteasen, die die Extrazellulärmembran (EZM) degradieren, erleichtert [70]. Nach Eindringen in den Blutkreislauf sind die Tumorzellen dem Immunsystem sowie Scherkräften durch den Blutstrom ausgesetzt. Nur 1 % der zirkulierenden Tumorzellen überleben dabei [71]. Es wurde gezeigt, dass Tumorzellen diesen Schwierigkeiten entgehen, indem sie sich an das vaskuläre Endothel, an Leukozyten oder an Thrombozyten anheften [72, 73]. Ein Nebeneffekt für die Anheftung an Thrombozyten ist das erhöhte Risiko für Tumorthromben, da die Tumorzellen den *tissue factor* (tf) als Rezeptor für Gerinnungsfaktoren exprimieren und somit die Gerinnungskaskade schneller in Gang gebracht wird [74]. Weiterhin können Tumorzellen intravaskulär proliferieren und sich als Zellklumpen zusammenlagern um weniger angreifbar zu sein [75]. Selbst bei einer Zirkulation von Millionen von Tumorzellen im Kreislauf, ist jedoch für die tatsächliche Ausbildung von Metastasen erst entscheidend, wenn Zellen sich im Kapillarbett eines Sekundärorgans festsetzen [76].

Im nächsten Schritt kommt es zum Zirkulationsstopp der Tumorzellen im Kapillarbett eines Sekundärorgans, wofür die Zellen wieder aus dem Blutkreislauf- oder Lymphsystem migrieren müssen [77]. Dieser Prozess wird als Extravasation bezeichnet. Entscheidend hierfür sind zum einen die Motilität der Tumorzellen und zum anderen die Permeabilität des Gefäßendothels, damit die Tumorzellen diese überwinden können. Die molekularen Grundlagen für diesen Prozess sind noch nicht eindeutig geklärt. Eine Hypothese besagt, dass Tumorzellen, die an Thrombozyten gebunden sind, in kleinen Kapillarbetten aufgrund ihrer Größe hängenbleiben [78, 79]. Zusätzlich wird dies durch den Effekt begünstigt, dass die Gefäßpermeabilität durch Expression von VEGF erhöht wird, wodurch endotheliale Zellverbindungen unterbrochen werden und die Extravasation erleichtert wird [80]. Eine weitere Begründung könnte die *seed and soil*-Theorie liefern. Diese besagt, dass Tumoren unterschiedlicher Ursprünge einzigartige

Metastasierungsmuster in spezifische Organe haben, in denen optimale Bedingungen für die Tumorzellen vorliegen (Abschnitt 2.2.2) [60]. Nach Einwanderung der migrierten Tumorzellen in ein Sekundärorgan kann es zu einem Ruhezustand der Zellen bzw. der Mikrometastasen kommen [77]. Generell bezeichnet ein Ruhezustand eines Tumors die Phase, in der dieser lange Zeit asymptomatisch bleibt und nicht weiterwächst. Klinisch können beispielsweise nach einer vermeintlich erfolgreichen Tumorthherapie noch Jahre später Metastasen auftreten. Es wurde gezeigt, dass ein solcher Ruhezustand sowohl in einzelnen Tumorzellen als auch in Mikrometastasen vorkommen kann [81]. Einzelne ruhende Tumorzellen können dabei Mechanismen ausbilden, dem Immunsystem zu entkommen [82]. Mikrometastasen befinden sich in einem Gleichgewicht zwischen Apoptose und Zellproliferation, so dass das Wachstum stagniert. Nur eine geringe Anzahl ruhender Tumorzellen beginnen schließlich tatsächlich mit der Ausbildung von Mikrometastasen und noch weniger werden letztendlich zu Makrometastasen [83]. Aus dem Ruhezustand auszubrechen und zu Mikrometastasen heranzuwachsen hängt davon ab, ob die Tumorzellen in der Lage sind, eine eigene Blutversorgung zu bilden (Angiogenese). In ruhenden Mikrometastasen besteht ein Gleichgewicht proangiogener (VEGF, PDGF, FGF und Angiopoietin) und antiangiogener Faktoren (Endostatin, Angiostatin, TSP) [84]. Gelingt es den ruhenden Mikrometastasen angiogene Faktoren im Überschuss auszuschütten und die antiangiogenen Faktoren zu supprimieren, können sie aus dem Ruhezustand ausbrechen und zu Makrometastasen heranwachsen.

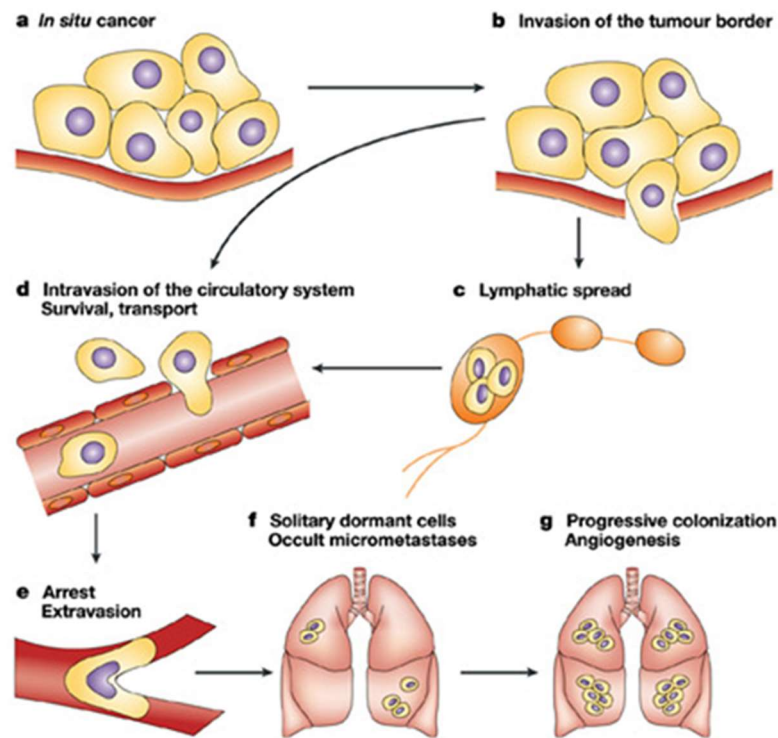


Abbildung 4. *multistep*-Prozess der Metastasierung beispielhaft für Lungenmetastasen. **a + b)** Verlust der Adhäsion von Tumorzellen des Primärtumors und Invasion in das umliegende Stroma. **c + d)** Intravasation in Lymph- oder Blutgefäße und Zirkulation der Tumorzellen im Kreislauf. **e)** Zirkulationsstopp und Extravasation im Kapillarnetz eines Sekundärorgans. **f)** Ruhende Tumorzellen oder Mikrometastasen im Sekundärorgan. **g)** Kolonisation und Angiogenese der migrierten Tumorzellen bzw. Mikrometastasen bis zur Ausbildung von Makrometastasen [85].

2.2.2 ORGANSPEZIFISCHE METASTASIERUNG

Lange wurde beobachtet, dass bestimmte Tumoren gehäuft in dieselben Organe metastasieren. Das Mammakarzinom metastasiert z.B. am häufigsten in die Knochen, die Leber, das Gehirn oder die Lunge. Prostatakarzinome bilden häufig Knochenmetastasen und das Kolonkarzinom Lebermetastasen. Für das NZK ist die Lunge mit über 60 % der Hauptmetastasierungsort, gefolgt von den Knochen (~35 %), der Leber (~20 %) und dem Gehirn (< 10 %) [9]. 1889 wurde die Tatsache, dass Tumoren bevorzugte Metastasierungsorte zeigen, durch die von Stephen Paget aufgestellte *seed-and-soil*-Theorie aufgegriffen. Danach neigen bestimmte Tumorzellen (*seed*) dazu, Metastasen in solchen Geweben auszubilden, in denen sie die für sie passenden Bedingungen (*soil*) vorfinden [86-88]. Demnach findet die Metastasenbildung nur dort statt, wo die Mikroumgebung

kompatibel mit den Eigenschaften und Ansprüchen der Tumorzellen ist. Diese Theorie bestimmte lange Zeit die Sichtweise auf die Metastasierung [58].

In den 1920er Jahren stellte Ewing eine konträre Theorie der organspezifischen Metastasierung auf, nach der die Tumorzellen sich aufgrund ihrer Größe im ersten Kapillarbett verfangen und dort Metastasen bilden [89]. Demnach wird der Ort der Metastasierung durch die Richtung des Blut- oder Lymphflusses bestimmt und die Tumorzelladhäsion in einem bestimmten Organ kommt allein durch physikalische Faktoren zustande.

Inzwischen hat sich durch diverse experimentelle Untersuchungen gezeigt, dass weder die eine noch die andere Theorie den Metastasierungsprozess vollkommen erfasst, sondern vielmehr eine Kombination von beiden zutrifft [59]. Ewing fokusierte auf den Migrationsprozess der Tumorzellen, während Paget auf die Immigration der Zellen in ein sekundäres Gewebe einging. Am Beispiel des Prostatakarzinoms erklärt die Theorie nach Ewing die Ausbildung von Metastasen über den Lymphweg in die lumbalen Wirbelkörper, während Paget's Theorie die Bevorzugung des Knochenmilieus als Metastasierungsort begründet [60, 90]. 2003 definierte Fidler et al. die *seed-and-soil*-Theorie erneut und betrachtete dabei besonders den Wanderungsprozess der Tumorzellen in der Blut- oder Lymphbahn [60, 86]. Demnach bestehen Primärtumoren aus einer heterogenen Subpopulation an Zellen mit unterschiedlichen angiogenen, invasiven und metastatischen Eigenschaften. Der Metastasierungsprozess ist dann selektiv für diejenigen Zellen, die erfolgreich die Migration in ein entferntes Sekundärorgan meistern. Die erfolgreiche Proliferation der metastasierenden Zellen hängt schließlich von deren Fähigkeit ab, mit der neuen Mikroumgebung zu interagieren und diese optimal nutzen zu können [60].

2.2.3 KNOCHENSPEZIFISCHE METASTASIERUNG

Charakteristisch für das Knochengewebe ist das Gleichgewicht zwischen ständigem Auf- und Abbau durch Osteoklasten und Osteoblasten. Damit geht die fortwährende Freisetzung von Wachstumsfaktoren einher, die die Migration von Tumorzellen steuern

und die Adhäsion an der Knochenmatrix fördern [91, 92]. Außerdem ist das Knochengewebe fein fenestriert, was die Migration der Zellen erleichtert. Aus diesen Gründen bietet das Knochengewebe besonders geeignete Bedingungen für die Infiltration, Adhäsion und Proliferation metastasierender Zellen [93]. Bei Störung der Homöostase im Knochen können schwerwiegende Folgen für den Körper resultieren. Etwa 30 % aller Patienten mit NZK entwickeln im Laufe ihrer Erkrankung Knochenmetastasen [9]. Damit einher gehen Schmerzen, Rückenmarkskompressionen, hohe Frakturraten, Hypercalcämie und stark erhöhte Mortalitätsraten [91, 94]. Unterschieden werden osteoblastische (knochenaufbauende) und osteolytische (knochenabbauende) Knochenmetastasen, wobei die osteolytischen mit einem Anteil von etwa 75 % am häufigsten gebildet werden [95]. Diese gehen meist von Mammakarzinom, Lungenkarzinom, Schilddrüsenkarzinom oder dem NZK als Primärtumoren aus [96]. Ein weiterer wichtiger Faktor sind Calciumionen, die beim Knochenumbau verstärkt freigesetzt werden und zur Verfügung stehen [97]. Sie aktivieren den CaSR, der, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, eine Rolle im Prozess der knochenspezifischen Metastasierung spielt. Ein entscheidender Prozess in der Ausbildung von Knochenmetastasen ist die Freisetzung des *parathormone-related protein* (PTHrP) aus Osteoklasten, was zur Differenzierung weiterer Osteoklasten und einem Ungleichgewicht in der Knochenhomöostase führt. Auf diesen Vorgang wird in Abschnitt 2.3.1 noch genauer eingegangen. Die destruiierende und demineralisierende Wirkung überwiegt dadurch, so dass sich Tumorzellen ausbreiten können [58]. Im Gegensatz dazu können Prostatakarzinom-Zellen Osteoblasten-stimulierende Faktoren, wie z.B. Wnt-Liganden, *bone morphogenic proteins* (BMP), *platelet derived growth factor* (PDGF) und Endothelin exprimieren. Sie führen zur Ausbildung der, für das Prostatakarzinom kennzeichnenden, osteoblastischen Metastasen. Tumorzellspezifische Signale führen zur Unterdrückung der osteoblastischen Osteoprotegrinproduktion, einem RANKL-Antagonist, der die RANKL-RANK-Interaktion und die Osteoklasten-Aktivierung blockiert. Dies führt zu einem Überwiegen der osteoblastischen Aktivität. Auf diese Weise wird die Art der Knochenmetastasen durch die tumorzellspezifische Signalfaktorausschüttung bestimmt [58].

2.3 DER CALCIUM-SENSITIVE REZEPTOR (CASR)

1993 gelang es Brown *et al.* erstmals einen Rezeptor aus bovinen Hauptzellen der Nebenschilddrüse zu klonieren, der bereits kleinste Änderungen der extrazellulären Calciumkonzentration detektierte – der sogenannte Calcium-sensitive Rezeptor (CaSR). Er gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) [98]. In den folgenden Jahren isolierten mehrere Forschergruppen analoge CaSR aus unterschiedlichen Geweben verschiedener Spezies [99]. Es stellte sich heraus, dass der CaSR in allen Geweben exprimiert wird, die an der Calciumhomöostase beteiligt sind: Nieren, Nebenschilddrüsen, Knochen und Gastrointestinaltrakt. Inzwischen wurde eine CaSR-Expression jedoch auch in Zellen anderer Gewebe, die keine Calcium-regulierende Funktion haben, nachgewiesen, wie z.B. in Gehirn-, Pankreas- oder Antrumzellen [100]. Calciumionen sind von zentraler Bedeutung für viele physiologische Prozesse. Der menschliche Organismus enthält etwa 1 kg Ca^{2+} , wovon 99 % als Mineralstoff in Knochen und Zähnen gebunden sind [101]. Extrazellulär ist Ca^{2+} als Faktor IV in der Blutgerinnung involviert, an der neuronalen Signalübertragung beteiligt und Kofaktor für diverse Moleküle und Enzyme [102, 103]. Intrazellulär dient es als neuromuskulärer Transmitter in Nerven und Muskeln, beeinflusst die Leitfähigkeit der Zellmembran für andere Ionen (z.B. Na^+ , K^+) und ist an der Sekretion von Drüsen beteiligt [99]. Die Plasmakonzentration an Ca^{2+} liegt physiologisch zwischen 2,2 mM und 2,6 mM und wird durch ein komplexes regulatorisches System nahezu konstant gehalten [104]. Die wichtigsten Organe zur Regulierung des Ca^{2+} -Spiegels sind die Nebenschilddrüsen und die Nieren. In den Nebenschilddrüsen werden extrazelluläre Ca^{2+} -Änderungen durch den CaSR detektiert und über eine negative Rückkopplung wird die Freisetzung von Parathormon (PTH) aus den Hauptzellen gesteuert. Dabei führen niedrige Ca^{2+} -Spiegel zu einer verminderten Aktivität des CaSR und zur verstärkten PTH-Sekretion. Außerdem wird die PTH-Genexpression stimuliert und die Proliferation der Epithelzellen gesteigert [99, 102]. Parathormon fördert in der Niere die Calcium-Rückresorption, stimuliert die Bildung von Calcitriol, das eine Erhöhung der Ca^{2+} -Aufnahme im Gastrointestinaltrakt bewirkt [105] und aktiviert die Calciumfreisetzung aus Knochen [105]. In der Niere ist der CaSR über das gesamte Nephron lokalisiert und

detektiert Konzentrationsänderungen sowohl des Urins als auch des interstitiellen Plasmas [106, 107]. Neben dem Ca^{2+} -Level reguliert er in der Niere auch direkt die Phosphathomöostase, den Transport mono- und divalenter Kationen, die Urinansäuerung und -konzentrierung sowie die Renin-Ausschüttung [107].

2.3.1 DIE ROLLE DES CASR UND CALCIUMS IN DER KNOCHENMETASTASIERUNG

Eine besondere Charakteristik von Knochen ist ihr hoher Gehalt an Calcium. Der CaSR als wichtigster Regulator der Calciumhomöostase wird sowohl in Osteoklasten, als auch in Osteoblasten exprimiert [108, 109]. Durch den dynamischen Prozess des Knochenauf- und Knochenabbaus sowie damit verbunden des Calciumspiegels werden bezüglich der Calcium-Konzentration in der Literatur unterschiedliche Angaben gemacht. Peacock *et al.* ermittelten eine extrazelluläre Calciumkonzentration von etwa 20 mM. Diese kann durch osteoklastische Aktivität bis auf 40 mM ansteigen [110]. In den letzten Jahren häuften sich die Hinweise, dass die hohe extrazelluläre Calcium-Konzentration in Knochen und die damit verbundene Aktivierung des CaSR entscheidende Faktoren für die Entstehung von Knochenmetastasen darstellen. Es wurde bereits gezeigt, dass der CaSR in die knochenspezifische Metastasierung des Prostata-, des Mammakarzinoms und des NZK involviert ist [10, 97, 111]. Saidak *et al.* zeigten, dass der Prozess der Knochenmetastasierung beim Prostatakarzinom mit Beteiligung des CaSR einen Signalweg über *extracellular signal-related kinase 1/ mitogen-activated protein-Kinase 2* (ERK1/2-MAPK) und die Phospholipase C- β (PLC- β) geht. In unserer Arbeitsgruppe wurde nachgewiesen, dass NZK-Gewebe von Patienten, die innerhalb von fünf Jahren nach einer Nephrektomie Knochenmetastasen entwickelt hatten, eine stark erhöhte CaSR-Expression im Vergleich zu Gewebe von Patienten ohne Knochenmetastasen aufzeigte. Dabei war das Resultat unabhängig von anderen Sekundärmetastasen. Außerdem reagierte CaSR-reiches Gewebe auf eine Calcium-Behandlung empfindlich mit einer Proliferationssteigerung und einer verstärkten chemotaktischen Migration. Für diesen metastasenfördernden Effekt des CaSR wurden unter anderem Signalwege über die AKT, Phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1), p38 α , c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) und ein Zusammenhang mit der Phosphatase PTEN identifiziert.

Es wird angenommen, dass der CaSR in Bezug auf die knochenspezifische Metastasierung in einem *circulus vitiosus* beteiligt ist (Abbildung 5). Der *circulus vitiosus* der Knochenmetastasierung wurde von Chirgwin und Guise beschrieben und wird durch das Einwandern von losgelösten Tumorzellen in Knochengewebe initiiert [112, 113]. Durch den ständigen Auf- und Abbau des Knochengewebes werden Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF- β freigesetzt, die metastasierende Tumorzellen zur Sekretion von *parathormone-related protein* (PTHrP), Prostaglandin E-2 (PGE-2) und *macrophage-colony-stimulating-factor* (m-CSF) stimulieren können. PTHrP stellt ein Parathormon-ähnliches Peptid dar, das von Tumorzellen ausgeschüttet wird und eine Parathormon-analoge Wirkung hat. Hier spielt der CaSR eine entscheidende Rolle, da er in gesunden Zellen gegensätzliche Effekte zeigt wie in malignen Zellen. In gesunden Zellen wird die Ausschüttung des PTHrP durch die Aktivierung des CaSR in Folge erhöhter Calcium-Konzentrationen gehemmt. Dagegen verstärkt der CaSR jedoch die Freisetzung dieses Peptids in malignen Zellen, wie die des Prostata- und des Mammakarzinoms [97, 114]. Dieser Prozess wird über einen ERK1/2-Signalweg induziert [115]. PTHrP fördert nun die Expression von RANKL (*receptor activator of NF- κ B-ligand*) in unreifen Osteoblasten, wodurch die Osteoklastenreifung über den Oberflächenrezeptor RANK auf Osteoklastenvorläuferzellen in Gang gesetzt wird [112, 116]. Es resultiert eine verstärkte Osteolyse. Hierdurch wird die Sekretion von Wachstumsfaktoren und Calcium erneut gesteigert und der CaSR verstärkt aktiviert. Die Tumorzellen werden somit weiter zum Wachstum angeregt und der Knochen weiter zerstört [116]. Ein Teufelskreis entsteht (Abbildung 5) [117].

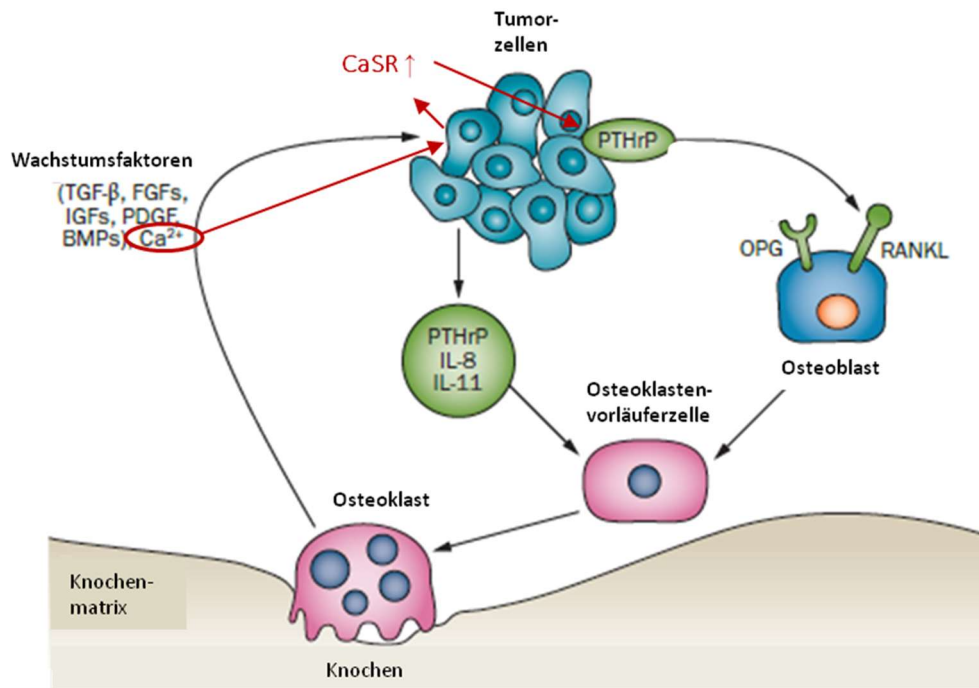


Abbildung 5. *circulus vitiosus* der Knochenmetastasierung. Tumorzellen werden durch vom Knochen ausgeschüttetes Ca²⁺ oder Wachstumsfaktoren, wie z.B. TGF-β zur Sekretion von PTHrP angeregt. Dieses fördert die RANKL-Expression auf unreifen Osteoblasten und die Osteoklastenreifung über Aktivierung des Oberflächenrezeptors RANK auf Osteoklastenvorläuferzellen. Es resultiert eine verstärkte Osteolyse, wodurch wiederum weitere Wachstumsfaktoren und Ca²⁺ freigesetzt werden. Modifiziert nach [118].

2.3.2 REGULATOREN DES CASR

Calcium stellt zwar den Hauptagonisten des CaSR dar, jedoch existieren eine Reihe weiterer Bindungspartner, die ebenfalls den CaSR aktivieren können. Dazu gehören divalente und trivalente Kationen wie Mg²⁺, Sr²⁺, La³⁺, Gd³⁺, sowie positiv geladene organische Moleküle wie Polyamine, Aminoglykoside, Antibiotika, Protamin und Polyarginin [107]. Eine weitere Gruppe von Liganden des CaSR setzen die Anwesenheit von extrazellulärem Calcium voraus [119]. Dabei handelt es sich um einige Aminosäuren sowie die allosterischen Aktivatoren des CaSR, die sogenannten Calcimimetics. Ein synthetisches Calcimimetic, das bereits in der klinischen Anwendung gegen sekundären Hyperparathyreoidismus bei dialysepflichtiger chronischer Niereninsuffizienz verwendet wird, ist Cinacalcet. Calcilytics, wie z.B. das synthetische NPS2143, sind allosterische Inhibitoren des CaSR [120, 121].

2.4 MICRO-RNA (MIRNA)

microRNA (miRNA) sind kurze, hochkonservierte, nicht codierende RNA-Moleküle mit einer Länge von 19 bis 23 Nukleotiden (nt). Sie regulieren posttranskriptionell die Genexpression, indem sie an die 3'untranslatierte Region (3'UTR) der mRNA von Zielgenen binden und damit deren Translation hemmen, oder die Degradierung der mRNA initiieren [1, 122]. Die Nukleotide 2-7 definieren die sogenannte *seed*-Region, deren Sequenz die mRNA festlegt, die von der miRNA gebunden wird [123, 124]. miRNA wurden erstmals 1993 beschrieben [125]. Sie sind an der Differenzierung von Zellen, dem Zellwachstum, der Zellproliferation und dem Zelltod beteiligt [126]. Die aktuelle Datenbank der miRBase (Release 21) enthält mehr als 35 000 reife miRNA in 223 Spezies, wovon mehr als 2500 human sind [127]. Inzwischen wird davon ausgegangen, dass 1 % des menschlichen Genoms für miRNA codiert, die rund ein Drittel der proteincodierenden Gene regulieren [128-130].

Die genaue biologische Funktion der meisten miRNA ist noch unbekannt, jedoch häufen sich die Ergebnisse, dass sie in diversen Pathologien fehlreguliert sind und in malignen Prozessen sowie bei der Metastasierung eine entscheidende Rolle spielen [2, 3]. miRNA-Fehlregulationen können im Blut, im Urin oder in Zellen detektiert werden. Diverse Arbeiten entdeckten bereits tumorspezifische Expressions-Profile, unter anderem für urologische Tumoren und das NZK [13, 131-133]. miRNA sind oft in Chromosomenregionen codiert, die anfällig für Deletionen, Amplifikationen und Translokationen sind. Sie können sowohl als Tumorsuppressor als auch als Onkogen wirken [134].

2.4.1 EXPRESSION VON MIRNA

miRNA-codierende Gene befinden sich im menschlichen Genom und sind dort in Exons oder Introns proteincodierender Gene oder in nichtcodierenden Regionen lokalisiert [135, 136]. Manche miRNA besitzen eigene Promotoren und ein geringer Teil der miRNA liegt in einem Cluster vor, in dem sie gemeinsam transkribiert werden. Die meisten miRNA werden von der RNA-Polymerase II transkribiert. Dabei hat das

Primärtranskript eine Länge von 500-3000 nt mit einem Poly-A-Schwanz am 3'-Ende und einer 7-Methylguanosin-Cap am 5'-Ende. Dieses erste Produkt wird *primary-miRNA* (*pri-miRNA*) genannt. Es lagert sich zu einer Schleife zusammen. Im nächsten Schritt wird die *pri-miRNA* im Kern zu einer 70-80 nt langen precursor-miRNA (*pre-miRNA*) prozessiert [137]. Verantwortlich dafür sind die RNase III (Drosha) und das dsRNA-Bindeprotein DGCR8, die zu einem Mikroprozessorkomplex zusammenlagern. Die *pre-miRNA* weist eine Haarnadelstruktur auf und wird dann durch Exportin 5 in Anwesenheit des Kofaktors RAN-GTP über die Kernporen der Kernmembran aktiv in das Zytoplasma exportiert. Dort wird sie dann durch das RNase III-Enzym "Dicer", das mit dem dsRNA-Bindeprotein interagiert, in 17-24 nt lange ds-miRNA zerschnitten. Die reife miRNA weist das 5'-Ende auf. Sie wird letztendlich in einen Ribonukleoproteinkomplex aufgenommen (miRNP). Wie genau die Aktivität der Zielgene herabreguliert wird, hängt vom Grad der Komplementarität ab. Wenn die Bindesequenz teilweise übereinstimmt, wird die Translation durch die Bindung gehemmt. Wenn eine sehr hohe Komplementarität besteht, wird die Degradierung der mRNA initiiert (Abbildung 6). Im Zusammenhang mit Krebs wurden verschiedene Funktionsweisen der miRNA beschrieben. Sie können zum Beispiel als Tumorsuppressoren wirken und unterdrücken dann zelluläre Tumorentstehungen. Bei fehlerhafter Bildung der miRNA können damit unerwünschte Prozesse verstärkt werden. Umgekehrt können miRNA aber auch ein onkogenes Potential besitzen. Bei vielen Tumoren wurde eine veränderte Expression im Sinne einer Hochregulation oder Herabregulation bestimmter miRNA gefunden [138, 139].

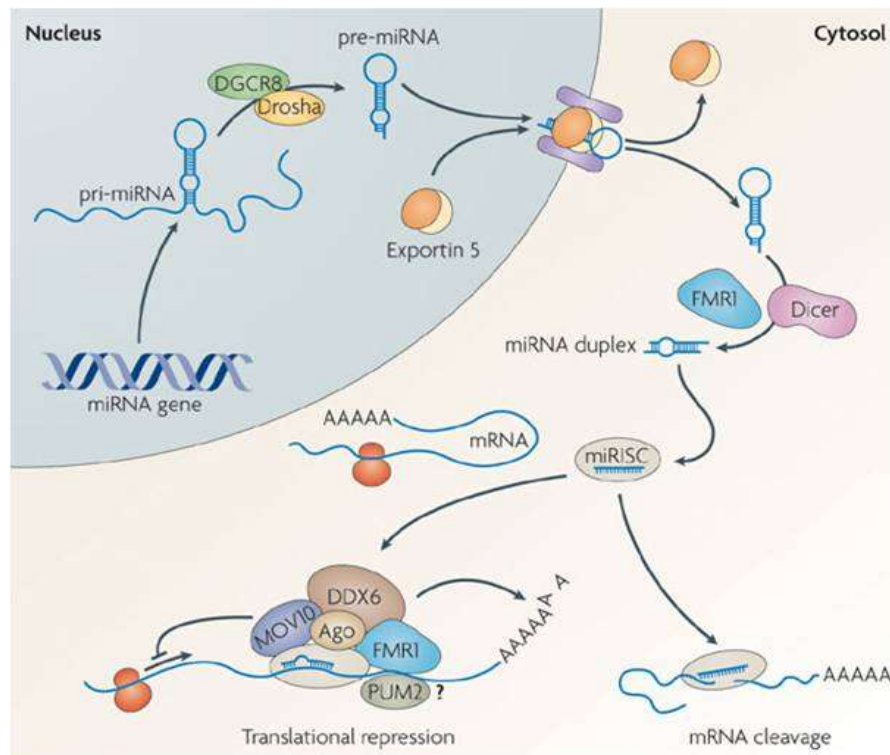


Abbildung 6. Mechanismus der Expression von miRNA [140].

2.4.2 miRNA IM NIERENZELLKARZINOM UND IN DESSEN KNOCHENSPEZIFISCHER METASTASIERUNG

Die bisherigen Forschungsergebnisse und Zusammenhänge mit malignen Entartungen, lassen auf ein großes Potential der miRNA für neue Therapieansätze und als Biomarker für Krebserkrankungen schließen. Lu *et al.* beschrieben, dass für manche schlecht differenzierte Tumoren das miRNA-Profilung in Abhängigkeit der Klassifikation des Tumors robuster sein könnte als das mRNA-Profilung [3]. Jedoch gibt es erst wenige Untersuchungen über die Zusammenhänge von miRNA mit Metastasierungsprozessen und über miRNA als prognostische Marker beim Nierenzellkarzinom.

Die erste Studie, die die miRNA-Expressionsprofile in unterschiedlichen Subtypen des NZK untersuchte, wurde von Petillo *et al.* durchgeführt [141]. Sie zeigten, dass die miRNA-Expressionsprofile nicht nur in Tumoren unterschiedlicher anatomischer Lokalisation, sondern auch in multiplen Tumorsubtypen einer Lokalisation variieren. Dabei konnten sie miRNA-Muster für vier NZK-Subtypen, das klarzellige, das papilläre, das chromophobe NZK und das Onkozytom, identifizieren und diese jeweils mit der

Prognose dieser Subtypen korrelieren. Heinzelmann *et al.* untersuchten miRNA-Expressionen in primären NZK-Zellen mit hohem metastatischem Potential und der Entwicklung von Metastasen im 5-Jahres-Zeitraum nach Nephrektomie und identifizierten dabei 12 signifikant fehlregulierte miRNA [13, 132]. In einer weiteren Untersuchung konnten sie zeigen, dass diese miRNA auch in primären Zellen der Metastasen fehlreguliert waren. Eingeschlossen war auch die Untersuchung von Knochenmetastasen. Slaby *et al.* fanden in einer breit angelegten Studie an 77 kNZK 64 prognostische miRNA, die mit einem hohen Rezidivrisiko nach Nephrektomie korrelierten [142]. Khella *et al.* zeigten, dass die miRNA 126 ein vielversprechender Marker für das metastasierte NZK ist [143]. Wu *et al.* identifizierten ein Expressionsmuster der vier miRNA 10b, 139, 130 und 199 als prognostische Marker für das Metastasierungsrisiko des NZK [144]. Mehrere Studien zeigten eine Korrelation zwischen erhöhten miRNA 21-Expressionen und der Prognose sowie der Progression [145-147]. Kürzlich berichteten Teixeira *et al.* von erhöhten Plasma-Level der miRNA 221 und 222 und einer Korrelation mit dem Vorhandensein von Metastasen sowie dem Gesamtüberleben [148]. Die aktuell veröffentlichten Ergebnisse von Chanudet *et al.* zeigen eine Korrelation von spezifischen miRNA-Signaturen im Plasma mit einem fortgeschrittenen NZK in Stadium III und IV und setzen Hoffnung in den Einsatz von miRNA als Biomarker [149]. Für die Frage nach einem Zusammenhang von miRNA mit dem CaSR in Bezug auf die Knochenmetastasierung des NZK waren besonders die Ergebnisse von Gong *et al.* von Bedeutung. Sie konnten eine Beteiligung der miRNA 374b an der Regulation der Ca²⁺-Homöostase über einen CaSR-miRNA-CLDN14-CLDN16/19-Signalweg in gesunden Nierenzellen von Mäusen zeigen [150-152]. In Abschnitt 5.3 wird hierüber ausführlich berichtet.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIALIEN

3.1.1 GERÄTE

Absaughilfe *Vacuboy* (IBS Integra Biosciences, Fernwald), CO₂-Inkubator *Hera Cell 150i* (Heraeus, Hanau), CO₂-Inkubator *Hera Cell 240* (Heraeus, Hanau), Eismaschine (Ziegra, Isernhagen), Gefrierschrank -20 °C (Bosch, Gerlingen), Gefrierschrank -80 °C (Nalgene Nunc Int., Penfield, USA), Gefrierschrank -85 °C *SuperCold 85* (Sanyo Gallenkamp, Etten-Leur, NL), *GloMax Multi Detection System* (Promega, Madison, USA), Heißluftsterilisator *Heraeus Oven* (Thermo Scientific, Waltham, USA), Kryo-Stickstofftank *Locator 6 Plus* (Thermo Scientific Thermoline, Langenselbold), Kühlschrankschrank 4 °C *Cooler* (Bosch, Gerlingen), Kühlzentrifuge *Heraeus Fresco 21* (Thermo Scientific, Waltham, USA), Labor-Feinwaage (Sartorius, Göttingen), Laborwaage *R160 P-D1* (Sartorius, Göttingen), *Matrix Electronic* Pipette (Thermo Scientific, Waltham, USA), Mikroskop *Axiovert 40CFL* (Zeiss, Oberkochen), Mikrozentrifuge *Fresco 21* (Heraeus, Hanau), Mini-Zentrifuge *Spectrafuge* (neoLab Migge, Heidelberg), *NanoDrop ND-3000* (PeqLab, Erlangen), *Perfect Spin Lightcycler* Platten-Zentrifuge (PeqLab, Erlangen), pH-Meter 211 (Hanna Instruments, Kehl am Rhein), *Real-Time PCR System Light Cycler 480 II* (Roche, Mannheim), Sicherheitswerkbank *Steri Flow* (Heraeus, Hanau), *SureScan Microarray Scanner* (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), *TProfessional* Thermocycler (Biometra, Göttingen), Vakuumpumpe *MiniVac Power* (PeqLab, Erlangen), Vortexmischer *VF2* (IKA, Staufen), Wasserbad *Aqualine AL18* (Lauda, Lauda-Königshofen), Zentrifuge *EBA 18 R* (Hettich Lab, Tuttingen), Vortexschüttler *VF2* (IKA, Staufen).

3.1.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN

CellStar Zellkulturflaschen (75 cm²) (Greiner BioOne, Frickenhausen), *CellStar* Zellkulturschalen (10 cm) (Greiner BioOne, Frickenhausen), *CellStar* Zellkulturplatten (6-Well, 96-Well) (Greiner BioOne, Frickenhausen), Einweghandschuhe (Nitril)

(Microflex, Österreich), *FrameStar* 96-Well PCR-Platten (4titude Ltd, Berlin), Glas-Pasteurpipetten (Carl Roth GmbH, Darmstadt), *PCR Tubes coloured* (STARLAB, Hamburg), Pipettenspitzen *TipOne* (0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 101-1000 µl) (StarLab, Ahrensburg), Polypropylen (PP-)Röhrchen (15 ml und 50 ml) (Greiner BioOne, Frickenhausen), *Q-Stick Adhesive* Folie für qRT-PCR (4titude Ltd, Berlin), *Safe-Lock* Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml) (Eppendorf, Hamburg), Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml) (Greiner BioOne, Frickenhausen), 8-Strip *PCR Tubes* (STARLAB, Hamburg), Terralin Liquid (Schülke & Mayr, Norderstedt), 96-Well Zellkulturplatten *black* (Greiner BioOne, Frickenhausen).

3.1.3 GEBRAUCHSMATERIALIEN

Cryo Freezing Container (Nalgene Nunc International, Penfield, USA), Multikanal-Pipette *Eppendorf Research* (0,5-10 µl, 10-100 µl) (Eppendorf, Hamburg), Neubauer Zählkammer (Merck, Darmstadt), Pipetten *Eppendorf Research* (0,5-10 µl, 1-100 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl) (Eppendorf, Hamburg), Pipettierhilfe *Accu-Jet Pro* (Brand, Wertheim).

3.1.4 CHEMIKALIEN

Amniomax C100 Basal Medium (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA), *Amniomax C100* Supplement (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA), Aqua dest. (B. Braun, Melsungen), Calciumchlorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Chloroform 99 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Dimethylsulfoxid (DMSO) 100 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Dulbecco's *Phosphate Buffered Saline* (1×) (DPBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Ethanol abs. (AppliChem, Darmstadt), Fötale Kälberserum (FCS) (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA), HCl 37 % (Merck, Darmstadt), Hybridisierungs *Spike-In Solution* (Agilent, Santa Clara, USA), *Labeling Spike-In Solution* (Agilent, Santa Clara, USA), Lipofectamine *RNAiMAX* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA), Natriumchlorid (Carl Roth, Karlsruhe), NPS2143 hydrochloride (Tocris33 Bioscience, Bristol, GB), *Nuclease-Free Water* (Quantabio, Beverly, USA), *Opti-MEM Reduced Serum Medium* (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA), *PerfeCTa SYBR Green Super Mix* (2×) (Quantabio, Beverly, USA), RPMI 1640 Medium (Gibco, Life Technologies, Carlsbad,

USA), *TaqMan* Universal Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, USA), Tris-HCl Pufferan p.a. (Carl Roth, Karlsruhe), Triton X-102 Gene Expression *Wash Buffer* (Agilent, Santa Clara, USA), Trypsin EDTA (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA).

3.1.5 PUFFER UND LÖSUNGEN

TE-Puffer (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8,0):

12,11 mg Tris-HCl

0,37 mg EDTA

10 ml Aqua dest.

Mit 37 % HCl auf pH 8,0 eingestellt und filtriert.

Labeling Spike-In Solution

2 µl *Dilution Spike-In*

198 µl RNase-freies Wasser

Hyb Spike-In Solution

2 µl *Dilution Lab Spike-In*

198 µl RNase-freies Wasser

Triton X-102 Gene Expression Wash Buffer

2 ml Triton X-102 (10 %)

Gene Expression Wash Buffer

3.1.6 KITS

Cell Proliferation assay Kit (BrdU Incorporation) (Roche Applied Science, Mannheim)

CellTox Green Cytotoxicity Assay (Promega, Mannheim)

microRNA Complete Labeling and Hybridization Kit (Agilent, Santa Clara, USA)

miRNA Microarray System (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

miRNeasy Mini Kit (Quiagen, Hilden)

PerfeCTa miR Assays (Quantabio, Beverly, USA)

PerfeCTa PreAmp Super Mix (Quantabio, Beverly, USA)

qScript microRNA cDNA Synthesis Kit (Quantabio, Beverly, USA)

TaqMan MicroRNA Assays (Life Technologies, Calsbad, USA)

TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Carlsbad, USA)

TaqMan PreAmp Master Mix Kit (Applied Biosystems, Waltham, USA)

RealTime Glo Cell Viability Assay (Promega, Mannheim)

3.1.7 TRANSFEKTIONSREAGENZIEN

mirVana miRNA Inhibitor (Ambion, Carlsbad, USA)

mirVana miRNA Inhibitor Negative Control (Ambion, Carlsbad, USA)

Lipofectamine *RNAiMax* Transfektionsreagenz

3.1.8 OLIGONUKLEOTIDE

PerfeCTa miR Assays (Quantabio, Beverly, USA) und *TaqMan* MicroRNA Assays (Life Technologies, Calsbad, USA) jeweils:

hsa-miR-23a-5p	5'-GGGGUCCUGGGGAUGGGAUUU-3'
hsa-miR-181c-5p	5'-AACAUUCAACCUGUCGGUGAGU-3'
hsa-miR-320c	5'-AAAAGCUGGGUUGAGAGGGU-3'
hsa-miR-374b-5p	5'-AUAUAAUACAACCUGCUAAGUG-3'
hsa-miR-424-5p	5'-CAGCAGCAAUUCAUGUUUUGAA-3'
RNU48	5'-AGTGATGATGACCCCAGGTA ACTCTTGAGTGTGT CGCTGATGCCATCACCGCAGCGCTCTGACC-3'
RNU6B	5'-CGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGT TCCATATTTTT-3'

3.1.9 TRANSFEKTIONSREAGENZIEN

mirVana miRNA Inhibitor

Lipofectamine *RNAiMax* Transfektionsreagenz

mirVana miRNA Inhibitor Negative Control

3.1.10 ZELLINIEN

3.1.10.1 786-O

Die Zelllinie 786-O (ATCC, Rockville MD, USA) wurde als eine der ersten kommerziell erhältlichen Zelllinien des klarzelligen Nierenzellkarzinoms entwickelt. Sie entstammt einem primären klarzelligen Adenokarzinom eines 58-jährigen Mannes kaukasischer Herkunft. 786-O-Zellen zeichnen sich durch einen hypertriploiden Chromosomensatz, eine VHL-Mutation sowie die Ausbildung von Mikrovilli und Desmosomen aus. Weiterhin bilden sie als Genexpressionsprodukt das *parathyroid hormone (PTH) like peptide* und wurden als CaSR-negativ nachgewiesen [8, 153, 154].

3.1.10.2 CASR-EXPPRIMIERENDE 786-O-ZELLEN

Haber *et al.* [155] gelang die Transfektion des CaSR-Gens in die Zelllinie 786-O. Mit Hilfe spezieller Primer amplifizierten sie das Gen aus bereits positiv getesteten Patientenproben in der PCR und klonierten es in einen Vektor. Drei der hergestellten Klone, CaSR1, CaSR4 und CaSR9, zeigten in unterschiedlichen Analyseverfahren eine deutliche Überexpression des CaSR und wurden in dieser Arbeit verwendet (CaSR-Zellen). Zum Vergleich wurden in den Experimenten jeweils Wildtypzellen (WT) und Leervektor pcDNA3-transfizierte Zellen (pcDNA3) herangezogen.

3.2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

3.2.1 STERILES ARBEITEN

Die Arbeit mit humanen Zelllinien erforderte eine konsequent sterile Arbeitsweise um Kontaminationen mit beispielsweise Bakterien, Pilzen oder Mykoplasmen zu vermeiden. Es wurden nur steril verpackte oder zuvor autoklavierte Arbeitsmaterialien verwendet. Die Zellkultivierung erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre. Medien und Reagenzien wurden bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Sterilbankfläche sowie die Gebrauchsmaterialien wurden vor und nach jedem Arbeitsgang mit Terralin Liquid desinfiziert.

3.2.2 ZELLKULTIVIERUNG

Die Kultivierung der Zelllinie 786-O wurde abhängig von den geplanten Versuchen in RPMI 1640-Vollmedium, Amniomax C100-Voll- oder Basalmedium, Amniomax+FCS oder *Opti-MEM Reduced Serum Medium* durchgeführt. Im Abstand von 3-5 Tagen waren die Böden der 75 cm²-Zellkulturflaschen zu etwa 80 % konfluent bewachsen, so dass das Passagieren der Zellen notwendig wurde. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt, die adhären Zellen dreimal mit 10 ml PBS gewaschen und dieses jeweils ebenfalls wieder abgesaugt. Zum Lösen der Zellen vom Flaschenboden wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA) bedeckt. Nach wenigen Minuten lösten sie sich unter vorsichtigem Schwenken und Beklopfen der Flaschen. Zugabe von frischem Medium stoppte die Reaktion ab bevor eine Zellschädigung eintrat. Durch Resuspension wurden die Zellen vereinzelt, je nach Bedarf entsprechend verdünnt und in neue Zellkulturflaschen überführt. In regelmäßigen Abständen wurde unter dem Lichtmikroskop das Zellwachstum beurteilt und auf Verunreinigungen kontrolliert.

3.2.3 ZELLZAHLBESTIMMUNG

Die Bestimmung der Zellzahl war bei allen Versuchen notwendig um eine definierte Ausgangsmenge an Zellen einzustellen. Dafür wurden ein Lichtmikroskop und eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Diese besteht aus einer Kammer mit vier eingeschliffenen Großquadraten, welche jeweils wiederum in 16 kleine Quadrate aufgeteilt sind. Seitlich der Kammer und des Deckglases wurden 15 µl einer Zellsuspension pipettiert, die durch Kapillarkraft in den Zwischenraum gezogen wurde. Die dafür eingesetzte Zellsuspension wurde analog des Passagierens von Zellen durch dreimaliges Waschen der Zellen, Ablösen mit Trypsin/EDTA sowie Resuspension mit Medium, gewonnen. Ausgezählt wurden jene Zellen, die sich im Inneren eines Großquadrats oder auf zwei seiner Ränder befanden. Daraus ließ sich anschließend mit Hilfe der folgenden Formel die Gesamtzahl bestimmen.

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{Volumen } [\mu\text{l}]} = \frac{\text{ausgezählte Zellen}}{\text{Volumen der Neubauerkammer } [\mu\text{m}^3] \cdot 4}$$

Dabei beträgt das Volumen der Neubauerkammer $V=10^{-4} \mu\text{m}^3$.

3.2.4 KONSERVIERUNG UND AUFTAUEN HUMANER ZELLINIEN

Die Konservierung humaner Zelllinien erfolgte durch die Lagerung in flüssigem Stickstoff. Zunächst wurden die Zellen dazu aus der Kultur in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt (Abschnitt 3.2.2) und für 5 min bei 300 ×g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes erfolgte die Resuspension des Zellpellets mit Amniomax +10 % DMSO auf 1 ml Volumen und anschließend die Aliquotierung in 1 ml Kryoröhrchen. Diese wurden über Nacht in einem Nalgene *Cryo Freezing Container* bei -80 °C inkubiert und anschließend in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen mit den benötigten Zellen dem Stickstofftank entnommen und der überschüssige Stickstoff vorsichtig abgegossen. Die Zellen wurden nun in einem Wasserbad bei 37 °C für zwei Minuten aufgetaut. Die anschließenden Schritte erfolgten unter sterilen Arbeitsbedingungen und dienten dem Entfernen des DMSO und der Überführung der Zellen in Zellkulturflaschen. Dazu wurde den Kryoröhrchen zunächst 1 ml Kulturmedium zugefügt, vorsichtig resuspendiert und die Zellsuspension in einem 15 ml PP-Röhrchen mit weiteren 3 ml Kulturmedium vermischt. Anschließend wurde sie bei 300 ×g für 5 min zentrifugiert. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet erneut in Kulturmedium resuspendiert und schließlich in 75 cm² Zellkulturflaschen überführt.

3.2.5 BEHANDLUNG DER ZELLEN MIT CALCIUM

Bei allen Versuchen wurden die Zellklone zur Aktivierung des CaSR jeweils mit Calcium (Ca²⁺) behandelt und mit den unbehandelten Zellen verglichen. Für die Ca²⁺-Behandlung wurden die Zellen in Zellkulturschalen überführt und in serumfreiem Medium (Amniomax) bis zu einer Konfluenz von etwa 80 % kultiviert. Dabei wurde jeweils eine unbehandelte Zellkultur zur Kontrolle mitgeführt. Anschließend wurde 1 M Calciumchlorid-Lösung auf die Zellen pipettiert und diese auf 10 mM eingestellt. Nun erfolgte eine Inkubation für 30 min im Zellinkubator. Das weitere Vorgehen orientierte sich an dem jeweils anschließenden Versuch.

3.2.6 BEHANDLUNG DER ZELLEN MIT NPS2143 ZUR HEMMUNG DES CASR

Um den Effekt des CaSR auf die Expression der miRNA untersuchen zu können, wurde dieser mit Hilfe von NPS2143 inhibiert. Je Zellklon wurden vier verschiedene Behandlungen durchgeführt und verglichen:

Tabelle 3. Behandlungen der Zellen.

Nummerierung	Behandlungsform
1 ^N	unbehandelt
2 ^N	10 mM Calciumchlorid (30 min Inkubation)
3 ^N	10 mM NPS2143 (60 min Inkubation)
4 ^N	10 mM NPS2143 (60 min Inkubation) + 10 mM Calciumchlorid (30 min Inkubation)

Mittels Zellzählung wurde eine Zellzahl von 5×10^5 eingestellt und die Zellen in 10 cm Zellkulturschalen überführt. Die Kultivierung erfolgte in serumfreiem Medium (Amniomax) bis zu einer Wachstumskonfluenz von etwa 80 %. Die Hälfte der Zellkulturschalen wurde nun mit 10 μ M NPS2143 für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Die Kulturansätze 2^N und 4^N wurden nach 30 min zusätzlich mit Calcium behandelt und für weitere 30 min im Brutschrank inkubiert. Das weitere Vorgehen orientierte sich an dem jeweils anschließenden Versuch.

3.2.7 TRANSFEKTION DER ZELLEN MIT MIRNA 23A-INHIBITOR

Die Transfektion mit miRNA-Inhibitor erfolgte zur Ausschaltung der miRNA 23a mit Hilfe des *mirVana* miRNA-Inhibitors und dem Lipofectamine RNAiMax Transfektionsreagenz entsprechend dem Herstellerprotokoll. Die miRNA 23a-inhibierten Zellen (Inh) wurden mit Zellen, die weder mit dem Inhibitor noch der Negativkontrolle transfiziert waren (n.b.) und einer Negativkontrolle (Neg) sowie jeweils deren Ca²⁺-behandelten Varianten verglichen (Tabelle 4).

Tabelle 4. Behandlungen der Zellen.

Nummerierung	Behandlungsform
1 ^T	unbehandelt
2 ^T	unbehandelt + 10 mM Calciumchlorid (30 min Inkubation)
3 ^T	+ Inhibitor
4 ^T	+ Inhibitor + 10 mM Calciumchlorid (30 min Inkubation)
5 ^T	Negativkontrolle
6 ^T	Negativkontrolle + 10 mM Calciumchlorid (30 min Inkubation)

Zunächst wurden die Zellen auf eine Zellzahl von 2×10^5 eingestellt, in 6-Well-Zellkulturschalen überführt und in 2,5 ml Amniomax + FCS je Well bis zu einer Zellkonfluenz von etwa 80 % kultiviert. Zur Herstellung eines Transfektionsreagenz' wurden 90 pmol des miRNA 23a-Inhibitors und 7,5 μ l *RNAiMax* mit Opti-MEM auf 500 μ l aufgefüllt und vorsichtig gemischt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Transfektionsreagenz vorsichtig tröpfelnd gleichmäßig auf die Wells verteilt und die 6-Well-Schale vorsichtig geschwenkt. Zur Ermittlung des optimalen Transfektionsergebnisses wurden zunächst zwei gleichartige 6-Well-Schalen hergestellt, wovon eine für 24 h im Brutschrank inkubiert, die andere für 48 h. 30 min vor Ablauf der Inkubationszeit wurde ein Teil der Zellen mit Ca^{2+} nach folgendem Schema behandelt:

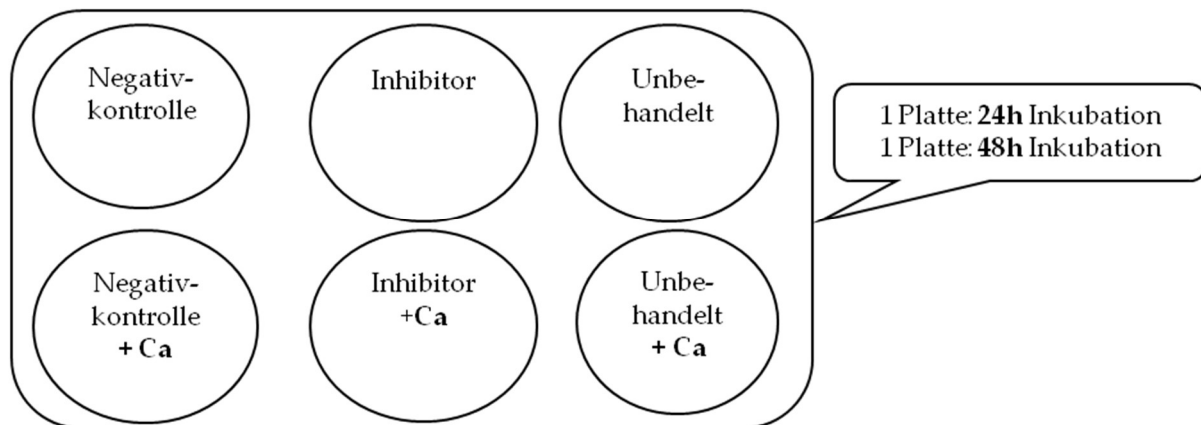


Abbildung 7. Verteilung der Zellen 1^T - 6^T auf eine 6-Well-Schale. Hergestellt wurden folgende Behandlungsformen: Negativkontrolle, Negativkontrolle + Ca^{2+} , miRNA 23a-Inhibitor (Inhibitor), miRNA 23a-Inhibitor + Ca^{2+} (Inhibitor + Ca^{2+}), unbehandelt und unbehandelt + Ca^{2+} .

Im Anschluss wurde aus den Zellen die Gesamt-RNA wie in Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2 isoliert, quantifiziert und auf Reinheit gemessen. Mittels reverser Transkription und qRT-PCR (Abschnitt 3.3.4.2) wurde der Transfektionserfolg überprüft.

3.2.8 ZELLVIABILITÄTSMESSUNG MIT HILFE DES GLOMAX-ASSAYS

Zur Messung des Proliferationspotentials der Zellen wurde der *CellTox Green Cytotoxicity Assay* und der *RealTime Glo Cell Viability Assay* (GloMax-Assay) nach dem Herstellerprotokoll angewendet. Es wurde dabei ein Vergleich zwischen mit miRNA 23a-Inhibitor-transfizierten Zellen, unbehandelten Zellen (weder mit Inhibitor noch Negativkontrolle transfiziert) und mit einer Negativkontrolle-transfizierte Zellen sowie jeweils deren Ca²⁺-behandelten Varianten durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen in Amniomax + FCS auf 6-Well-Schalen ausplattiert. Dafür wurde je Well eine Zellzahl von 5×10^5 ausgezählt. Bei einer Wachstumskonfluenz von etwa 80 % wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.2.7 transfiziert.

Tabelle 5. Behandlungen der Zellen.

Nummerierung	Behandlungsform
1 ^P	unbehandelt
2 ^P	unbehandelt (zur späteren Ca ²⁺ -Behandlung)
3 ^P	Inhibitor
4 ^P	Inhibitor (zur späteren Ca ²⁺ -Behandlung)
5 ^P	Negativkontrolle
6 ^P	Negativkontrolle (zur späteren Ca ²⁺ -Behandlung)

Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen auf schwarzen 96-Well-Platten mit einer Zellzahl von 1×10^5 ausplattiert und mit jeweils 50 µl serumfreiem Medium kultiviert. Dabei wurden von jeder Probe Triplets ausplattiert. Nach weiteren 24 h Inkubation im Brutschrank wurden je Well 50 µl der Proliferationslösung zugegeben. Diese wurde aus 15 µl *CellTox Green*, 15 µl *RealTimeGlo* und 2,5 ml Amniomax + FCS hergestellt. Nach 30 min Inkubation im Brutschrank wurde in 30 min Abständen die Lumineszenz und Fluoreszenz im *GloMax*-Detektor beginnend mit Zeitpunkt t_0 gemessen. Nach der zweiten Messung (t_1) wurden die Zellen mit Calcium behandelt und es folgten weitere halbstündige Messungen bis mindestens t_8 .

3.2.9 ZELLPROLIFERATIONSMESSUNG MIT HILFE DES BRDU-ASSAYS

(BROMDESOXYURIDIN-INKORPORATION)

Mit Hilfe des *Cell Proliferation ELISA BrdU-Kit* (BrdU-Assay) wurde das Proliferationspotential von miRNA 23a-inhibierten Zellen, unbehandelten Zellen (ohne

miRNA 23a-Inhibitor oder Negativkontrolle) und Zellen, die mit Negativkontrolle transfiziert waren, quantifiziert. In allen drei Fällen wurde das Proliferationspotential mit und ohne Calcium-Zugabe verglichen. Die Methode basiert auf der Messung einer BrdU-Inkorporation während der DNA-Synthese in der Zellteilung. Das Pyrimidinanalogon BrdU wird dabei an Stelle von Thymidin in die DNA eingebaut. Nach Denaturierung der DNA wird das eingebaute BrdU mittels des ELISA-Prinzips detektiert. Dazu wird ein spezifischer Peroxidase-gekoppelter Antikörper des BrdU zugegeben, sodass BrdU mittels Substratreaktion detektiert werden kann. Durch die Peroxidase wird dabei ein Substrat des Antikörpers zu einem Farbstoff umgewandelt, welcher photometrisch gemessen werden kann und in Relation zum BrdU-Einbau steht.

Zunächst wurden die Zellen in 6-Well-Schalen ausplattiert und in Amniomax + FCS bis auf eine Wachstumskonfluenz von etwa 80 % kultiviert. Anschließend erfolgte die Transfektion mit miRNA 23a-Inhibitor wie in Abschnitt 3.2.7 beschrieben. Es wurden analog der Transfektion von Zellen sechs Behandlungen zum Vergleich durchgeführt, wobei die Calcium-Behandlung erst direkt vor Beginn des BrdU-Tests erfolgte.

Tabelle 6. Behandlungen der Zellen.

Nummerierung	Behandlungsform
1 ^B	unbehandelt
2 ^B	unbehandelt (zur späteren Ca ²⁺ -Behandlung)
3 ^B	+ Inhibitor
4 ^B	+ Inhibitor (zur späteren Ca ²⁺ -Behandlung)
5 ^B	Negativkontrolle
6 ^B	Negativkontrolle (zur späteren Ca ²⁺ -Behandlung)

Anschließend wurden die Zellen ausgezählt und 1×10^5 Zellen in 100 μ l/Well serumfreiem Medium auf 96-Well-Schalen in Triplets ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 23,5 h im Brutschrank erfolgte die Calcium-Behandlung und eine weitere Inkubation für 30 min. Der erste Schritt des BrdU-Assays bestand aus der Behandlung der Zellen mit 10 μ l/Well *BrdU-Labeling Solution* und der anschließenden Inkubation für 2 h im Brutschrank. Dieser Schritt dient dem Einbau des BrdU in die DNA. Anschließend wurden die Lösungen vorsichtig entfernt und jedes Well mit 200 μ l *Fix-Denat Solution* zur Denaturierung der DNA versetzt. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur. Parallel dazu wurde der BrdU-Antikörper 1:100 mit *Dilution*

Solution verdünnt um eine *Anti-BrdU-POD Working Solution* herzustellen. Davon wurden jedem Well 100 µl zugefügt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Um die überschüssigen Antikörper und BrdU-Rückstände zu entfernen, folgten nun drei Waschschrte mit jeweils 200 µl *Washing Solution* (1×) je Well. Um die Substratreaktion durchzuführen, wurden nun 100 µl *Substrate Solution* je Well pipettiert und für 30 min in Dunkelheit und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung färbte sich dabei blau. Zum Abstoppen der Substratreaktion wurden 25 µl 1 M Schwefelsäure je Well zugegeben und unter schwachem Schütteln 1 min inkubiert. Dabei fand ein sichtbarer Farbumschlag von blau nach gelb statt. Die Absorption wurde im *GloMax* Multidetektor bei 450 nm gemessen.

3.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.3.1 EXTRAKTION DER GESAMT-RNA

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde das *miRNeasy* Mini Kit entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet. Dazu wurden die Zellen, wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, in 10 cm Zellkulturschalen überführt und kultiviert. Die Zellzahl wurde dabei auf 7×10^5 eingestellt. Bei etwa 80 % Wachstumskonfluenz wurde das Medium abgekippt und 700 µl *Quiazol Lysis Reagent* auf die Zellen pipettiert. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vom Schalenboden gelöst und durch eine Pipette in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Homogenisierung wurde das Zellysate für eine Minute im Vortexschüttler gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 140 µl Chloroform zur Dissoziation von Nukleoprotein-Komplexen zugefügt und vorsichtig 15 s geschüttelt. Nach weiteren drei Minuten Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zentrifugation für 15 min bei 12000 ×g und 4 °C. Dieser Schritt bewirkt eine Phasentrennung in eine obere wässrige Phase, die die RNA enthält, eine mittlere weiße Phase und eine rötliche organische Phase im unteren Teil des Reaktionsgefäßes. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig mit einer Eppendorf-Pipette abgetragen und in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurde die 1,5-fache Menge 100 % Ethanol gegeben und vorsichtig resuspendiert. Nun wurde das Gemisch auf eine *RNeasy* Mini spin *Column* übertragen, diese in ein 2 ml

Auffanggefäß gestellt und bei 8500 ×g und 25 °C für 15 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Im Folgenden wurden einige Waschschriffe durchgeführt, um die Gesamt-RNA von Verunreinigungen wie z.B Proteinen oder Phenolen zu isolieren . Zunächst wurden 700 µl RWT-Puffer auf jede Säule aufgetragen, die Säulen ebenfalls bei 8500 ×g und für 15s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nun wurden 500 µl RPE-Puffer auf die Säule aufgetragen, 2 min bei 8500 ×g und 25 °C zentrifugiert und der Durchfluss ebenfalls verworfen. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Die Gesamt-RNA konnte anschließend mit Hilfe von 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert werden. Dieses wurde direkt auf die Säulenmembran aufgetragen. Nach 1 min Zentrifugation bei 8500 ×g und 25 °C befand sich nun die Gesamt-RNA im Zentrifugat. Sie wurde, wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, am NanoDrop quantifiziert und auf Reinheit geprüft.

3.3.2 QUANTIFIZIERUNG UND REINHEITSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN MIT HILFE DES NANODROP

Nach Extraktion der Gesamt-RNA aus Zellmaterial wurde diese photometrisch an einem *NanoDrop*-Spektrophotometer quantifiziert und auf Reinheit geprüft. Je Probenmessung wurden dafür 1,5 µl des Extraktes eingesetzt. Initial erfolgte eine Leermessung mit 1,5 µl RNase-freiem Wasser. Die Absorption der Probe wurde am Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren, bei 260 nm, gemessen. Hieraus kann durch das Lambert-Beer'sche Gesetz die RNA-Konzentration berechnet werden. Gleichzeitig können durch einen Absorptionsvergleich der Wellenlängen 230 nm, 260 nm und 280 nm potentielle Verunreinigungen, z.B. durch Chemikalien der vorangegangenen Extraktion, ausgeschlossen werden. Der Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ sollte für RNA idealerweise zwischen 1,9 und 2,1 liegen. Davon abweichende Werte kommen beispielsweise bei einer Verunreinigung mit Phenolen oder Proteinen, deren Absorptionsmaxima bei 280 nm liegen, vor. Sie können aus den vorherigen Extraktionsschritten mitgeschleppt werden oder durch unsauberes Arbeiten vorliegen. Das Verhältnis OD₂₆₀ zu OD₂₃₀ gibt zusätzlich Aufschluss über eine mögliche Verunreinigung mit Stoffen, die bei 230 nm absorbieren, wie z.B. phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), Ethylendiamintetraessig-

säure (EDTA) oder Polysacchariden. Dieser Wert sollte für RNA-Messungen bei 0,45 liegen.

3.3.3 miRNA-EXPRESSIONSANALYSE

Um zu untersuchen, welches miRNA-Expressionsmuster die Zellen aufweisen, wurde mit isolierter Gesamt-RNA eine miRNA-Expressionsanalyse durchgeführt. Dabei wurden das miRNA *Microarray System* und miRNA *Complete Labeling and Hybridization Kit* entsprechend dem Herstellerprotokoll angewendet.

Die Expressionsanalyse besteht aus drei Schritten. Zunächst wurde eine Labeling-Reaktion durchgeführt, bei der die RNA-Proben dephosphoryliert, denaturiert und mit fluoreszierendem Cyanine3-pCp markiert wurden. Dazu wurde die Gesamt-RNA auf 50 ng/µl eingestellt. 2 µl der verdünnten RNA-Probe wurden in einem eisgekühlten 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 2 µl *Calf Intestinal Phosphatase (CIP) Master Mix* (Tabelle 7) gemischt und bei 37 °C für 30 min zur Dephosphorylierung inkubiert.

Tabelle 7. Herstellung eines CIP Master Mix.

Komponente	1 Reaktionsansatz [µl]
CIP <i>Buffer</i> (10×)	0,4
<i>Labeling Spike-In Solution</i>	1,1
CIP	0,5
Gesamtvolumen	2,0

Nun wurden 2,8 µl DMSO 100 % zugegeben und die Lösung für 5 min bei 100 °C inkubiert (Denaturierung). Anschließend erfolgte die Überführung in ein Eisbad um die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu unterbinden.

Als nächstes wurde die Ligation-Reaktion durchgeführt. Hierfür wurde zunächst ein Ligation Master Mix wie in Tabelle 8 hergestellt.

Tabelle 8. Herstellung eines Ligation Master Mix.

Komponente	1 Reaktionsansatz [µl]
T4 RNA Ligase <i>Buffer</i> (10×)	1,0
Cyanine3-pCp	3,0
T4 RNA Ligase	0,5
Gesamtvolumen	4,5

Der Reaktionsansatz wurde mit 4,5 µl des Ligation Master Mix gemischt, zentrifugiert und für 2 h bei 16 °C im Dunkeln inkubiert. Die nun fluoreszenzmarkierten RNA-Proben

(Gesamtvolumen 11,3 µl) wurden anschließend in einer Vakuumzentrifuge für 3 h bei 55 °C komplett getrocknet um DMSO-Rückstände zu entfernen. Diese können sonst die spätere Hybridisierungsreaktion beeinträchtigen.

Der zweite Schritt des miRNA Microarrays besteht aus der Hybridisierung der Proben. Dazu wurde der Reaktionsansatz aus Schritt 1 in 17 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und mit 4,5 µl GE *Blocking Agent* (10×), 1 µl *Hyb Spike-In* Lösung und 22,5 µl *HiRPM Hybridization Buffer* (10×) gemischt. Anschließend folgte eine 5 minütige Inkubation bei 100 °C, dann eine weitere Inkubation für 5 min im Eiswasserbad und schließlich die Zentrifugation der Proben.

Im dritten Schritt erfolgte die Auftragung der Proben auf den Microarray. Dieser enthält 2549 Sonden für humane miRNA entsprechend der miRBase-Datenbank 21.0. Ein miRNA Microarray ist auf die Messung von acht Proben ausgelegt. Beim Auftragen der Proben und Verschießen der Kammer wurde darauf geachtet, dass der eingeschlossene Reaktionsansatz frei von Luftblasen war. Der Microarray wurde nun in den Hybridisierungssofen eingespannt und für 20 h bei 55 °C unter Rotation mit 5 ×g hybridisiert. Anschließend wurde der Microarray in frischem Triton X-102 *Gene Expression Wash Buffer* unter Rühren zunächst 5 min bei RT und dann 5 min bei 37 °C gewaschen.

Der fertige miRNA Microarray konnte nun mit Hilfe des *SureScan* Microarray Scanner gescannt werden. Die Rohdaten wurden mit der *Qluore Omics Explorer* Software generiert.

3.3.4 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der exponentiellen Vervielfältigung (Amplifikation) von spezifischen Nukleotidsequenzen. Das Prinzip beruht auf einer enzymatischen Kettenreaktion und wurde 1983 von Kary Mullis [156] entwickelt. Für die Durchführung einer PCR werden eine DNA- oder RNA-Sequenz (Template), die vervielfältigt werden soll, sowie zwei Primer (synthetische Oligonukleotide) benötigt. Letztere binden spezifisch an eine komplementäre Nukleotidsequenz des Templates und markieren somit jeweils den Startpunkt der Replikation. Für die enzymatische

Replikation wird eine hitzestabile DNA-Polymerase, die Taq-Polymerase (aus dem hitzeadaptierten Bakterium *Thermus aquaticus*), eingesetzt. Als Bausteine dienen Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs).

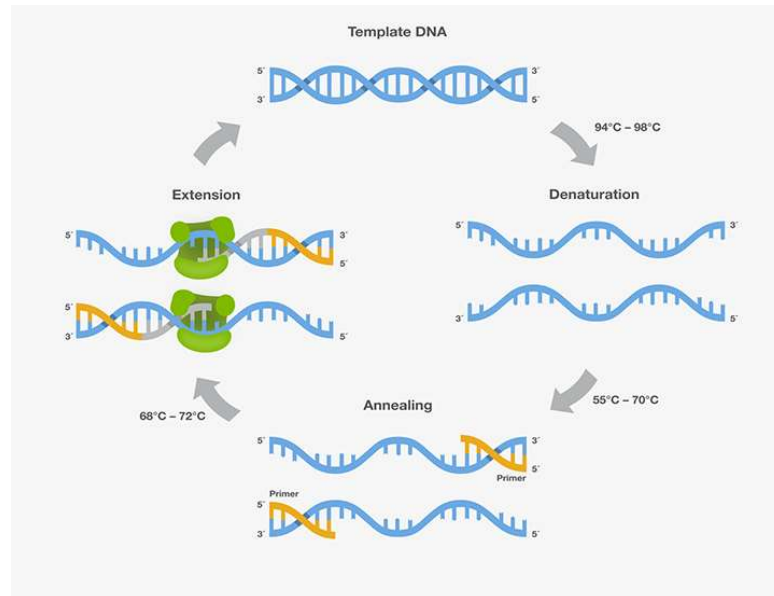


Abbildung 8. Ablauf einer PCR in drei Schritten: Denaturierung, Annealing und Amplifikation [157].

Der Ablauf einer PCR besteht aus drei Schritten (Abbildung 8). Zunächst wird die doppelsträngige Ausgangs-DNA durch Denaturierung bei $90-96^{\circ}\text{C}$ in Einzelstränge aufgetrennt. Im zweiten Schritt (Annealing) erfolgt bei einer Temperatur zwischen $55-70^{\circ}\text{C}$ die Anlagerung der Primer an die komplementäre Sequenz auf den DNA-Einzelsträngen. Im dritten Schritt (Amplifikation) wird mit Hilfe der Polymerase die DNA synthetisiert. Ausgehend vom Primer liest die Polymerase das Template ab und bindet daran die jeweils komplementären Nukleotide. Es resultieren zwei neue Helices, die jeweils aus einem Ursprungs-DNA-Einzelstrang und einer komplementären Kopie bestehen. Nach diesem Mechanismus entstehen in n Wiederholungen der drei Schritte $2^{(n-1)}$ neue DNA-Moleküle [158].

3.3.4.1 DIE REAL-TIME-PCR (QRT-PCR)

Eine bedeutende methodische Weiterentwicklung der PCR stellt die quantitative Echtzeit-PCR oder auch Real-Time-PCR (qRT-PCR) genannt dar, die zum ersten Mal von Higuchi *et al.* vorgestellt wurde [159, 160]. Sie ermöglicht neben der Amplifikation von kleinen Nukleinsäuresequenzen auch deren Quantifizierung. Diese beruht auf einer

Fluoreszenzmessung, die in der Regel durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen, wie Ethidiumbromid oder SYBR-Green, ermöglicht wird. Diese Farbstoffe besitzen die Eigenschaft, in die DNA zu interkalieren oder an ihre kleine Furche zu binden, was zu einer Zunahme ihrer Fluoreszenz führt. Die Detektion erfolgt während oder nach jedem PCR-Zyklus. In jedem Zyklus nehmen die Menge der gefärbten DNA sowie damit einhergehend die Fluoreszenzstärke exponentiell zu. Zwischen beiden Größen besteht eine Korrelation, sodass aus der Fluoreszenzstärke die DNA-Menge errechnet werden kann. Ein Nachteil der Methode besteht in ihrer geringen Spezifität, da zwischen unterschiedlichen Produkten nicht unterschieden werden kann. Deshalb bietet sich abhängig von Versuch und Fragestellung die Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse an. Dabei werden die doppelsträngigen DNA-Fragmente denaturiert, wodurch die Fluoreszenzfarbstoffe wieder freigesetzt werden. Die Länge und Nukleotid-Zusammensetzung der DNA-Sequenzen bestimmen spezifisch die Schmelzkurve und Schmelztemperatur. Weitere Methoden zur Quantifizierung sind der Einsatz von FRET-Sonden, Hybridisierungssonden, *TaqMan*-Sonden (Hydrolysesonden), *LoopTag*-Sonden, Molecular Beacons (*stem-loop*-Primer), *Sunrise*- und *Scorpion*-Primer, Lux-Primer oder Lanthanid-markierte-Sonden [161].

3.3.4.2 QUANTIFIZIERUNG VON MIRNA MITTELS QRT-PCR

Die Quantifizierung von miRNA stellte aufgrund ihrer geringen Nukleotidlänge eine neue Herausforderung für die Weiterentwicklung der PCR dar. Inzwischen stehen unterschiedliche Assays dafür zur Verfügung. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Systeme verwendet. Zum einen das *TaqMan*-System bestehend aus *TaqMan* MicroRNA Reverse Transcription Kit und *TaqMan* MicroRNA Assay. Zum anderen das Quanta-System bestehend aus *qScript* microRNA cDNA Synthesis Kit und dem *PerfeCta* microRNA-Assay.

3.3.4.2.1 TAQMAN-SYSTEM

Die Grundlage der miRNA-Detektion und Quantifizierung beruht bei der *TaqMan*-Methode auf dem Einsatz eines miRNA-spezifischen *stem-loop*-Primers. Durch dessen

Bindung an das 5'-Ende der miRNA entsteht ein verlängertes Produkt, das mit den Standard-qRT-PCR-Assays nach dem *TaqMan*-Prinzip gemessen werden kann.

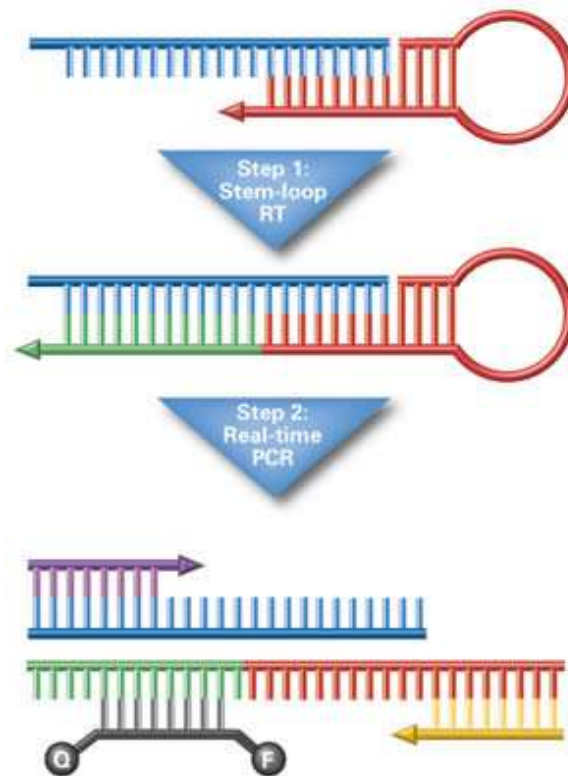


Abbildung 9. Mechanismus des TaqMan miRNA Assays [162].

Die miRNA-Detektion erfolgt nun in zwei Schritten (Abbildung 9). Zunächst bindet der *stem-loop*-Primer spezifisch an die miRNA. Diese wird mit Hilfe der reversen Transkription in ein verlängertes Produkt umgeschrieben. Anschließend erfolgt die *Real-Time*-PCR mit einem *forward* und einem *reverse* Primer sowie einer Fluorophormarkierten Sonde, die die 5'-Nukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase ausnutzt (Abbildung 10). Sie besteht aus einem Fluoreszenzreporter am 5'-Ende und einem Quencher am 3'-Ende. Durch eine Energieübertragung nach dem Prinzip des Förster-Resonanzenergietransfers (*fluorescence resonance energy transfer* (FRET)) wird die Fluoreszenz des Reporters durch den Quencher unterdrückt solange sich die beiden Moleküle in Nachbarschaft zueinander befinden. Sobald die TaqMan-Sonde spezifisch an eine komplementäre DNA-Sequenz bindet, wird diese durch die Taq-Polymerase verlängert und gespalten. Dabei wird der Fluoreszenzreporter frei und zeigt ein ansteigendes Fluoreszenzsignal, das zur miRNA-Menge korreliert.

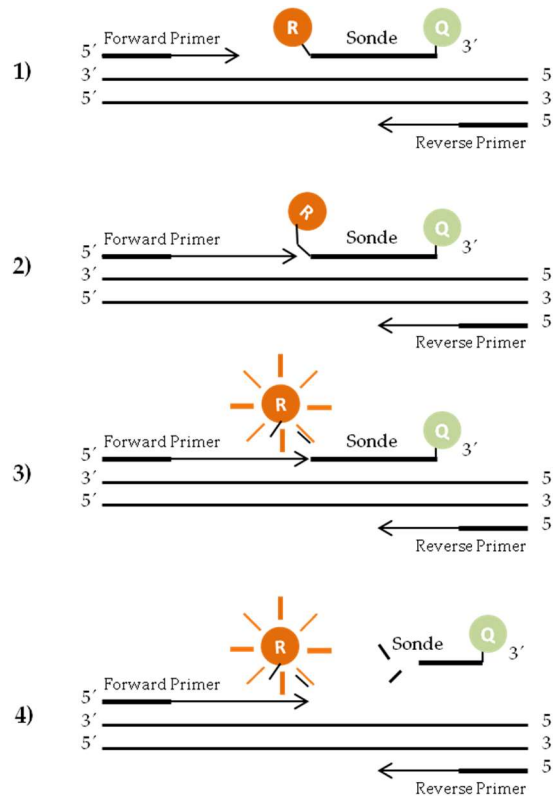


Abbildung 10. Grundprinzip des *TaqMan*-MasterMix. Modifiziert nach [163]. Die Detektion erfolgt in vier Schritten: 1) Komplementäre Bindung der Sonde an den DNA-Strang. Fluoreszenzreporter und Quencher sind an eine TaqMan-Sonde in unmittelbarer Nachbarschaft gebunden. 2) Das Fluoreszenzsignals des Reporters wird durch den Quencher unterdrückt solange die Sonde intakt bleibt. 3) In jedem Transkriptionszyklus wird die Sonde durch die Taq-Polymerase gespalten. 4) Der Reporter wird frei und fluoresziert.

Zunächst wurde aus isolierter Gesamt-RNA mit Hilfe des *TaqMan* MicroRNA *Reverse Transcription* Kit cDNA geschrieben. Dazu wurde für jeden 15 µl Reaktionsansatz 7 µl RT Master Mix hergestellt.

Tabelle 9. Herstellung von 7 µl RT Master Mix.

Komponente	Master Mix-Volumen pro 15 µl-Reaktion
100 mM dNTPs (mit dTTP)	0,15 µl
<i>Multiscribe Reverse Transcriptase</i> , 50 U/µl	1,00 µl
10× <i>Reverse Transcription Buffer</i>	1,50 µl
RNAse Inhibitor, 20 U/µl	0,19 µl
<i>Nuclease-free water</i>	4,16 µl
Gesamtvolumen	7,00 µl

Die Gesamt-RNA wurde mit RNAse-freiem Wasser auf 30 ng/µl eingestellt. Schließlich wurde der vorbereitete RT Master Mix mit 5 µl Gesamt-RNA vereint, gemischt, zentrifugiert und in 0,2 ml Reaktionsgefäße überführt. Nun erfolgte die Zugabe von 3 µl

RT-Primer (5×) und die Lagerung auf Eis für 5 min. Die reverse Transkription wurde anschließend im Thermocycler bei folgenden Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 10. Thermocycler-Einstellungen für die RT-Reaktion.

Zeit [min]	Temperatur [°C]
30	16
30	42
5	85
∞	4

Nach Herstellung der cDNA wurde diese mit Hilfe des *TaqMan* Micro RNA Assays und qRT-PCR im *LightCycler 480* amplifiziert und quantifiziert. Jede Reaktion wurde mit einem Reaktionsvolumen von 20 µl und in Replikaten angesetzt. Die dafür verwendeten Reaktionskomponenten sind in Tabelle 11 aufgeführt. Hiervon wurde zunächst ein PCR Master Mix, bestehend aus *TaqMan* Universal PCR Master Mix, Nuklease-freiem Wasser und *TaqMan* Small RNA Assay (20×) hergestellt. Auf einer gekühlten PCR-Reaktionsplatte wurde dieser mit dem RT-Reaktionsprodukt zusammengeführt.

Tabelle 11. Reaktionszusammensetzung für die qRT-PCR-Reaktion.

Komponente	Volumen [µl]	
	20 µl Reaktion	2 Replikate + 20 % Überschuss
<i>TaqMan</i> Universal PCR Master Mix II	10 µl	22 µl
<i>Nuclease free water</i>	7,5 µl	16,5 µl
<i>TaqMan</i> Small RNA Assay (20×)	1 µl	2,2 µl
RT-Reaktionsprodukt	1,5 µl	3,3 µl
Gesamtvolumen	20 µl	44 µl

Weiterhin wurden zu jeder Reaktion drei Negativproben bestehend aus 18,67 µl PCR Master Mix und 1,33 µl Nuklease-freiem Wasser mitgeführt, um Verunreinigungen mit cDNA auszuschließen. Die fertige PCR-Reaktionsplatte wurde mit einer luftdichten Folie verschlossen, 1 min zentrifugiert und bei den in Tabelle 12 angegebenen Bedingungen im *Lightcycler* amplifiziert und detektiert.

Tabelle 12. Reaktionsbedingungen für die qRT-PCR-Reaktion am *LightCycler 480*.

	Enzymaktivierung	PCR (40 Zyklen)	
		Denaturierung	Annealing
Temperatur	95 °C	95 °C	60 °C
Zeit	10 min	15 s	60 s

Jedem Zyklus schloss sich eine Fluoreszenzmessung an, mittels derer der *Crossing Point* (Cp) bestimmt werden konnte. Dabei handelt es sich um den Wert, an dem

erstmals die Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Aus den ermittelten Cp-Werten wurde anschließend der Mittelwert gebildet. Zur Effizienzbestimmung wurden Standardreihen angelegt indem die cDNA in vier Stufen 1:10 verdünnt wurde. Die Effizienz ergibt sich dann anhand der Geradensteigung aus den ermittelten Cp-Werten.

Da die Signale der untersuchten miRNA häufig erst bei Cp-Werten über 40 kamen und damit große Fehlerwerte verbunden waren, wurden die Versuchsbedingungen auf unterschiedliche Weisen variiert (Abschnitt 5.7) und eine Vervielfachung der cDNA mittels Präamplifikation (Abschnitt 3.3.4.2.2) herbeigeführt.

3.3.4.2.2 PRÄAMPLIFIKATION MITTELS *TAQMAN* PREAMP MASTER MIX

Eine Präamplifikation mittels *TaqMan* PreAmp Master Mix dient der Vervielfachung sehr geringer Mengen an Ausgangs-cDNA für die anschließende qRT-PCR-Analyse. Hiermit können in einem Pool bis zu 100 Proben (miRNA) für die RT-Reaktion vorbereitet werden.

Zunächst wurde ein RT-Master Mix nach dem in Tabelle 13 angegebenen Schema hergestellt.

Tabelle 13. Herstellung des RT-Master Mix für die Präamplifikationsreaktion.

Komponente	Eingesetztes Volumen für 15 µl Reaktionsansatz [µl]	7 Proben +3 Proben Überschuss [µl]
RT Primer Pool*	6	60
100 mM dNTPs (mit dTTP)	0,3	3
<i>Multiscribe</i> RT (50 U/µl)	3	30
10 × RT Puffer	1,5	15
RNAse Inhibitor (20 U/µl)	0,19	1,9
Nuklease-freies Wasser	1,01	10,1
Gesamtvolumen	12	120

* Für den RT-Primer Pool wurden *TaqMan* RT-Primern (5×) jeweils auf eine Konzentration von 0,05× eingestellt.

Für die RT-Reaktion wurden 12 µl des vorbereiteten RT-Master Mix mit 3 µl Gesamt-RNA-Probe (350 ng) vorsichtig gemischt, zentrifugiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Die cDNA wurde im Thermocycler bei den in Tabelle 14 angegebenen Geräteeinstellungen transkribiert.

Tabelle 14. Thermocycler-Einstellungen für die RT-Reaktion.

Zeit [min]	Temperatur [°C]
30	16
30	42
5	85
∞	4

Der durch reverse Transkription entstandene cDNA-Pool wurde nun mittels eines Primerpools und dem *TaqMan* PreAmp Master Mix Kit präamplifiziert. Zunächst wurde dafür ein Reaktionsansatz, bestehend aus *TaqMan* PreAmp Master Mix (5×), einem PreAmp Primer Pool und Nuklease-freiem Wasser, hergestellt.

Tabelle 15. Herstellung eines PreAmp Reaktionsansatzes.

Komponente	Eingesetztes Volumen [μl]	7 Proben +3 Proben Überschuss [μl]
<i>TaqMan</i> PreAmp Master Mix (5×)	5	50
PreAmp Primer Pool*	3,75	37,5
Nuklease-freies Wasser	13,75	137,5
Gesamtvolumen	22,5	225

* Der PreAmp Primer Pool bestand aus *TaqMan* MicroRNA Assays (20×), die mit Nuklease-freiem Wasser auf einen Stoffmengenanteil von 0,2× eingestellt wurden.

Nun wurden 22,5 μl des PreAmp Reaktionsansatzes mit 2,5 μl des RT-Produktes vorsichtig gemischt, zentrifugiert und schließlich im Thermocycler zur Reaktion gebracht.

Tabelle 16. Thermocycler-Einstellungen für die Präamplifikationsreaktion.

	Zeit	Temperatur [°C]
	2 min	95
12 Zyklen Präamplifikation	15 s	95
	4 min	60
	10 min	99,9
	∞	4

Pro miRNA-Probe wurde anschließend 1 μl des Präamplifikationsproduktes im Verhältnis 1:5 mit TE-Puffer verdünnt. Die qRT-PCR wurde anschließend mit Hilfe des *TaqMan* Micro RNA Assays, wie in Abschnitt 3.3.4.2.1 beschrieben, durchgeführt.

3.3.4.2.3 QUANTA-METHODE

Die Methode von Quanta nutzt die Detektion mittels SYBR Green für die Quantifizierung der miRNA. Im ersten Schritt wird mit Hilfe des *qScript* microRNA cDNA *Synthesis* Kit eine universelle cDNA synthetisiert. Dazu werden die miRNA in einer Poly(A)-Polymerase-Reaktion polyadenyliert. In Anwesenheit einer reversen Transkriptase, eines Oligo-dT-Adapter-Primers sowie dNTPs wird die polyadenylierte miRNA in cDNA umgeschrieben. Die spezifische Sequenz am 5'-Ende des Oligo-dT-Adapter-Primers ist komplementär zum *PerfeCTa* Universal Primer, so dass letzterer für die Amplifikation und Detektion in der qRT-PCR mit einem spezifischem miRNA Primer (*PerfeCTa* miR Assays) und SYBR-Green kombiniert werden kann (Abbildung 11).

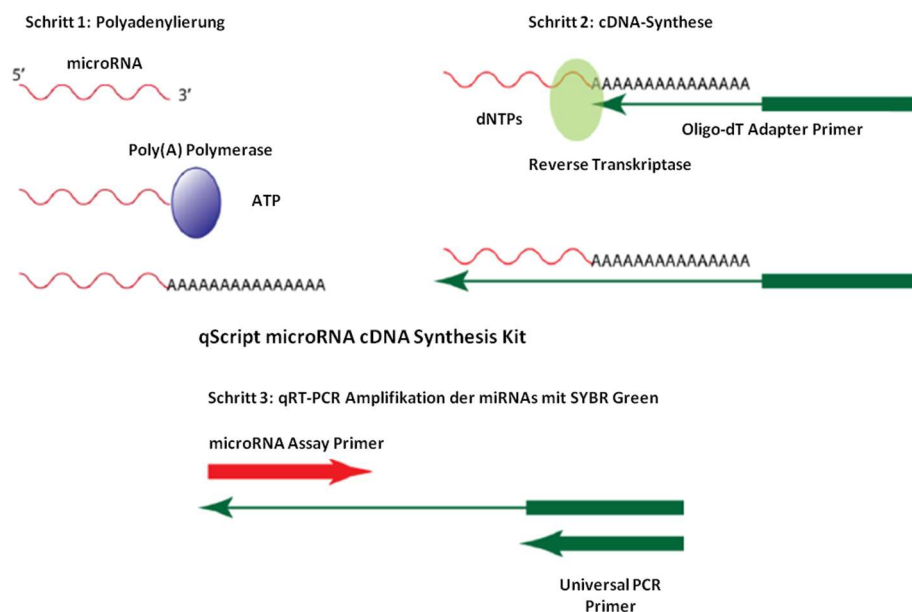


Abbildung 11. Ablauf der reversen Transkriptasereaktion mit *qScript* microRNA cDNA *Synthesis* Kit und qRT-PCR mit *PerfeCTa* miR Assays [164].

Die Durchführung erfolgte in drei Schritten: der Poly-(A)-*Tailing*-Reaktion, der cDNA-Reaktion und der qRT-PCR mit SYBR Green. Für die Poly-(A)-*Tailing*-Reaktion wurde die isolierte Gesamt-RNA auf 1000 ng/ μ l mit RNase-freiem Wasser eingestellt (Tabelle 17). Die Reaktionskomponenten wurden auf Eis gestellt, in 0,2 ml Reaktionsgefäßen zusammengegeben, vermischt und zentrifugiert.

Tabelle 17. Schritt 1: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Poly-(A)-*Tailing*-Reaktion.

Komponente	Eingesetztes Volumen [μ l]
Poly-(A)- <i>Tailing</i> -Buffer (5 \times)	2
Gesamt-RNA in Nuklease-freiem Wasser (1000 ng/ μ l)	7
Poly-(A)-Polymerase	1
Gesamtvolumen	10

Die reverse Transkriptionsreaktion wurde bei den in Tabelle 18 angegebenen Geräteeinstellungen im Thermocycler durchgeführt.

Tabelle 18. Schritt 1: Thermocyclerbedingungen für die Poly-(A)-*Tailing*-Reaktion.

Zeit [min]	Temperatur [$^{\circ}$ C]
60	37
5	70

Aus dem hergestellten Poly-(A)-*Tailing*-Produkt wurde anschließend cDNA geschrieben. Dazu wurde es mit microRNA cDNA *Reaction Mix* und *qScript Reverse Transcriptase* (Tabelle 19) versetzt, vermischt, zentrifugiert und im Thermocycler inkubiert (Tabelle 20).

Tabelle 19. Schritt 2: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die RT-Reaktion.

Komponente	Eingesetztes Volumen [μ l]
Poly-(A)- <i>Tailing</i> -Produkt aus Schritt 1	10
microRNA cDNA <i>Reaction Mix</i>	9
qScript Reverse Transcriptase	1
Gesamtvolumen	20

Tabelle 20. Thermocycler-Bedingungen für die RT-Reaktion.

Zeit [min]	Temperatur [$^{\circ}$ C]
20	42
5	85

Die hergestellte cDNA lag nun in einer Konzentration von 1000 ng/ 20 μ l vor. Das RT-Produkt wurde im Verhältnis 1:20 mit TE-Puffer verdünnt, um eine Konzentration von 2,5 ng/ μ l cDNA einzustellen (**V1**). **V1** wurde zur Herstellung einer Standardreihe verwendet, indem sie mit TE-Puffer in den Stufen 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80 verdünnt wurde. Für die anschließende PCR wurde **V1** ein weiteres Mal 1:10 mit TE-Puffer verdünnt (**V2**).

Im dritten Schritt erfolgte die qRT-PCR mit Hilfe des für jede miRNA spezifischen Primers (*perfeCTa* miR Assay Primer (10 μ M)), dem Universal Primer (*perfeCTa* Universal PCR-Primer (10 μ M)), SYBR Green und Nuklease-freiem Wasser (Tabelle 21). Die

Komponenten wurden auf Eis gelagert, gemischt, zentrifugiert und schließlich im 20 µl-Ansatz auf eisgekühlte PCR-Platten pipettiert, wobei jeweils Dupletts angelegt wurden. Außerdem wurden zu jeder miRNA zwei Negativproben mitgemessen um Verunreinigungen mit cDNA ausschließen zu können. In diesen Negativproben wurde an Stelle der cDNA Nuklease-freies Wasser verwendet. Die fertigen PCR-Platten wurden mit luftdichter Folie verschlossen, 1 min zentrifugiert und bei den, in Tabelle 22 angegebenen Bedingungen im Thermocycler inkubiert. Für die Auswertung wurden die Cp-Werte in Bezug zu der angelegten Standardreihe gesetzt, die Standard-Cps < 0,3 gewählt und jedes gemessene Proben-Duplett gemittelt. Außerdem wurden aus zwei voneinander unabhängigen Zellkulturansätzen Extrakte gewonnen und die qRT-PCR-Messungen reproduziert (n = 1 und n = 2). Die gemittelten Ergebnisse wurden auf das GeoMittel der Standard-miRNA bezogen und auf pcDNA3 = 1 normiert.

Tabelle 21. Schritt 3: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die qRT-PCR-Reaktion.

Komponente	Eingesetztes Volumen [µl]
perfeCTa SYBR Green Super Mix	10
perfecta miR Assay Primer (10 µM)	0,4
perfecta Universal Primer (10 µM)	0,4
RNAse freies Wasser	5,2
cDNA (V2)	4
Gesamtvolumen	20

Tabelle 22. Schritt 3: Reaktionsbedingungen für die qRT-PCR-Reaktion am *Lightcycler*.

	Enzymaktivierung	PCR (40 Zyklen)		
		Denaturierung	Annealing	Fluoreszenzdetektion
Temperatur	95 °C	95 °C	60 °C	70 °C
Zeit	2 min	5 s	15 s	15 s

3.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Zur Auswertung der Daten wurde das Programm Microsoft Excel und die Qluore Omics Explorer Software verwendet. Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede bei Zwei-Gruppen-Vergleichen wurde ein t-Test angewendet, wobei ein p-Wert < 0,01 oder < 0,05 und eine FC ≥ 1 oder 1,5 festgelegt wurden.

4 ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit sollten miRNA identifiziert werden, die in einem möglichen Zusammenhang mit dem CaSR stehen und an der knochenspezifischen Metastasierung des NZKs beteiligt sein könnten. Bei 2549 humanen miRNA, die in der miRBase verzeichnet sind, wurde zunächst ein Screening auf veränderte miRNA-Expressionen zwischen CaSR-überexprimierenden Zellen und Kontrollzellen durchgeführt (miRNA-Expressionsanalyse). Anschließend wurden diese Ergebnisse via qRT-PCR validiert und mittels Hemmung des CaSR oder miRNA-Inhibition der Einfluss der miRNA auf zelluläre Prozesse wie Proliferation und Viabilität untersucht.

4.1 miRNA-EXPRESSIONSANALYSE MIT HILFE DES miRNA MICROARRAY

Die miRNA-Expressionsanalyse diente zunächst der Identifizierung von miRNA, die in CaSR-exprimierenden NZK-Zellen gegenüber Zellen vom WT signifikant veränderte Expressionsunterschiede aufwiesen. Dabei war besonders die Auswirkung einer Calcium-Behandlung der Zellen auf die miRNA-Expressionsunterschiede von Interesse. Die Analyse wurde an 786-O-Zellen vom WT und CaSR-transfizierten 786-O-Zellen (CaSR1-Zellklon) durchgeführt, aus denen in vier unabhängigen Ansätzen Gesamt-RNA gewonnen und eingesetzt wurde. Der Rezeptor wurde durch 30 min Inkubation mit 10 mM Ca^{2+} aktiviert. Zur Ermittlung der miRNA, die signifikante Expressionsunterschiede aufwiesen, wurden die statistischen Parameter auf einen p-Wert $< 0,01$ oder $< 0,05$ und eine *Fold Change* (FC) ≥ 1 oder 1,5 festgelegt. Die miRNA-Expressionsunterschiede wurden unter unterschiedlichen Aspekten ausgewertet (Abbildung 12).

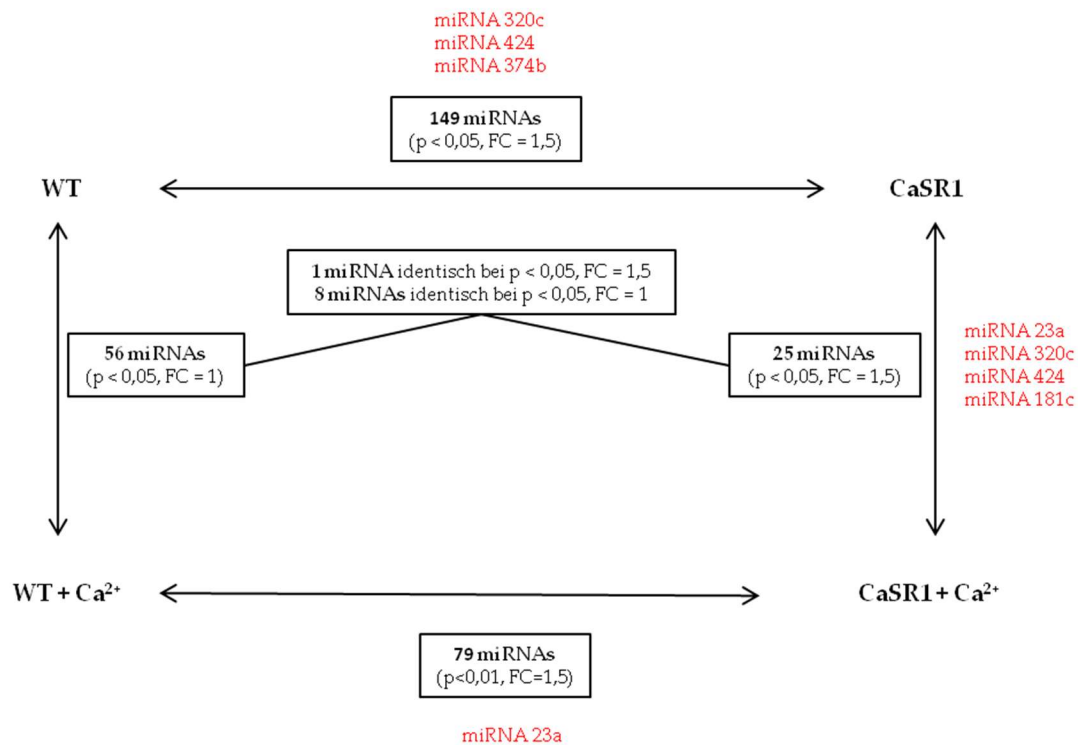


Abbildung 12. Verschiedene Vergleichsaspekte, die für die Auswertung der Microarray Expressionsanalyse herangezogen wurden. Verglichen wurden WT mit CaSR1, WT mit WT + Ca²⁺, CaSR1 mit CaSR1 + Ca²⁺ und WT + Ca²⁺ mit CaSR1 + Ca²⁺. Die Expression der miRNA 320c, 424 und 374b waren im Vergleich zwischen 786-O-WT- und CaSR1-Zellen mit $p < 0,05$ und $FC \geq 1,5$ verändert. Die miRNA 23a, 320c, 424 und 181c wurden in CaSR1-Zellklonen nach Calcium-Behandlung signifikant verändert exprimiert ($p < 0,05$, $FC \geq 1,5$). Im Vergleich von WT-Zellen und CaSR1-Zellklonen jeweils nach Calcium-Behandlung zeigte unter anderen die miRNA 23a eine signifikante Expressionänderung. Statistische Auswertung: t-Test.

Ausgewertet wurde zunächst im Hinblick darauf, welche miRNA generell zwischen CaSR1- und WT-786-O-Zellen verändert exprimiert wurden (95 miRNA mit $p < 0,01$ und $FC \geq 1,5$). Schließlich wurde untersucht, welche miRNA nach Ca²⁺-Behandlung im Vergleich zu nicht-behandelten Zellen einen Expressionsunterschied aufwiesen. Signifikante Änderungen zwischen WT und WT + Ca²⁺ wurde bei 56 miRNA mit $p < 0,05$ und einer $FC \geq 1$ beobachtet, während dies im Vergleich von CaSR1 mit CaSR1 + Ca²⁺ bei 25 miRNA der Fall war ($p < 0,05$, $FC \geq 1,5$). Bei $p < 0,05$ und $FC \geq 1,5$ war eine miRNA in beiden Gruppen vertreten, während bei einer $FC \geq 1$ acht miRNA in den beiden Gruppen identisch waren. Die 24 miRNA, deren Expression nur in den CaSR-Zellklonen, aber nicht in WT-Zellen nach Calcium-Behandlung signifikant verändert waren ($p < 0,05$, $FC \geq 1,5$), erschienen für die weitere Arbeit besonders interessant (Abbildung 13). Für die weiteren Analysen wurden daraus diejenigen miRNA ausgewählt, die aufgrund ihrer zellphysiologischen Bedeutung interessant erschienen.

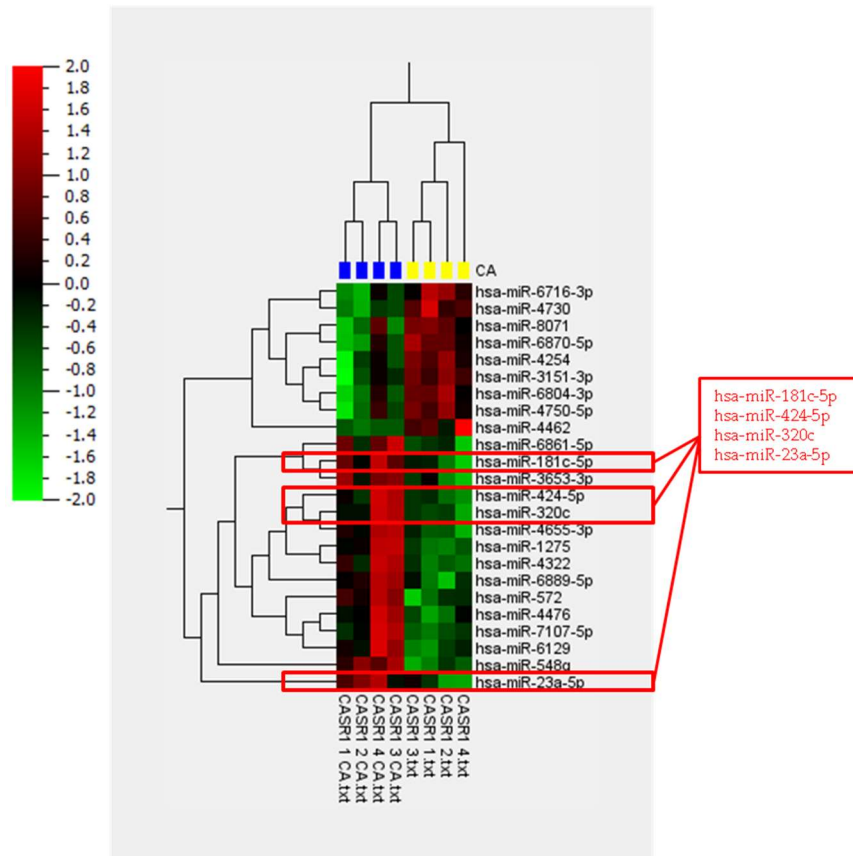


Abbildung 13. Ergebnisse der miRNA-Expressionsanalyse, dargestellt in einer Heatmap. Aufgeführt sind miRNA, die in der miRNA-Expressionsanalyse im Vergleich CaSR1 mit CaSR1 + Ca²⁺, jedoch nicht bei WT und WT + Ca²⁺, signifikante Änderungen zeigten. Statistische Auswertung: t-Test, p-Wert < 0,05; FC ≥ 1,5.

Mit Hilfe des Vergleichs von Literaturdaten konnte der Fokus dabei auf vier miRNA eingegrenzt werden, die bereits im Zusammenhang mit Krebs oder Metastasierungsprozessen unterschiedlicher Entitäten beschrieben wurden. Ausgewählt wurden die miRNA 23a, miRNA 181c, miRNA 320c und die miRNA 424. Sie alle reagierten in der Microarray-Analyse mit einer Expressionszunahme auf die Calcium-Aktivierung. Die miRNA 424 und miRNA 320c wiesen außerdem signifikante Expressionsunterschiede im Vergleich von WT-Zellen mit CaSR-Zellen auf, wobei hierbei die WT-Zellen die stärkere miRNA-Expression zeigten (Abbildung 14). Die miRNA 23a zeigte eine signifikant höhere Expression in Calcium-behandelten CaSR-Zellen im Vergleich zu Calcium-behandelten WT-Zellen (Abbildung 14). Gong *et al.* beschrieben, dass die Calcium-Rückresorption in der Niere durch den parazellulären Claudin-Kanal der absteigenden Henleschleife gesteuert wird und dieser durch einen Signalweg über eine Claudin-14-miRNA 374b-CaSR-Achse beeinflusst wird [150-152].

Aufgrund dieser Ergebnisse erschien die miRNA 374b im Zusammenhang mit dem CaSR ebenfalls interessant und wurde mit in die Analysen eingeschlossen. In der Microarray-Expressionsanalyse lag ein signifikanter Expressionsunterschied dieser miRNA zwischen WT-Zellen und CaSR-Zellen mit einem p-Wert $< 0,01$ und einer $FC \geq 1,5$ vor (Abbildung 14).

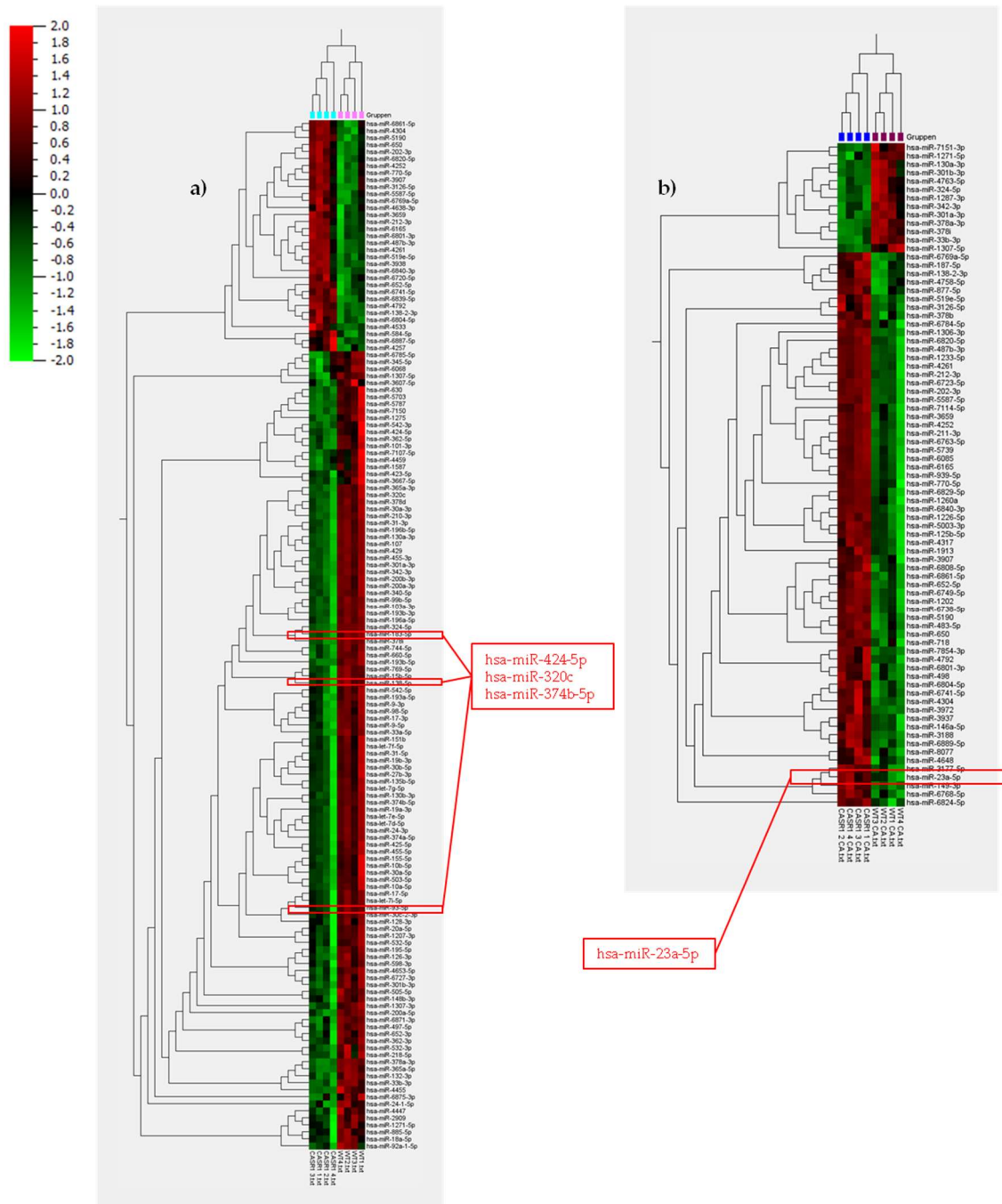


Abbildung 14. Ergebnisse der miRNA-Expressionsanalyse, dargestellt in einer Heatmap. **a)** Aufgeführt sind miRNA, die in der miRNA-Expressionsanalyse im Vergleich zwischen WT und CaSR mit $p < 0,05$ und $FC \geq 1,5$ signifikant verändert waren. Darunter sind die miRNA 424, 320 und 374 enthalten. **b)** Diese Heatmap zeigt die miRNA, die im Vergleich von WT + Ca²⁺ und CaSR + Ca²⁺ signifikant verändert waren, unter anderem die miRNA 23a ($p < 0,05$, $FC \geq 1,5$). Statistische Auswertung: t-Test.

4.2 VALIDIERUNG DER SCREENING-ERGEBNISSE DURCH PCR- QUANTIFIZIERUNG

Zur Validierung der Microarray-Ergebnisse wurden die fünf im Microarray identifizierten und ausgewählten miRNA mittels qRT-PCR nachgewiesen und quantifiziert. Als Bezugsstandards dienten die miRNA RNU6 und RNU48, da von diesen eine weitgehend konstante Expression in unterschiedlichen Körperzellen angenommen werden kann (Abschnitt 4.2.1) [165, 166]. Die qRT-PCR-Messungen wurden an 786-O-Zellen vom WT, dem pcDNA3-Leervektor und den Transfektionsklonen CaSR1, CaSR4 und CaSR9 jeweils mit und ohne Ca²⁺-Behandlung (30 min, 10 mM), wie in Abschnitt 3.3.4.2.3 beschrieben, durchgeführt.

4.2.1 AUSWAHL DER STANDARD-MIRNA RNU49 UND RNU6

Um mittels qRT-PCR valide Ergebnisse bezüglich des miRNA-Expressionsniveaus und diesbezüglichen Änderungen zu erhalten, war die Normalisierung gegen Referenzgene notwendig. Hierfür eignen sich miRNA, die in dem untersuchten Gewebe unabhängig einer malignen Entartung konstant exprimiert werden. Die am häufigsten verwendeten Referenzgene für miRNA-Expressionsuntersuchungen stellen *small nuclear RNA* (SNOR) dar. Dazu zählen die RNU6B [27, 54, 167] und RNU48 [13, 168]. Wotschofsky *et al.* untersuchten gängige Normalisierungsgene für miRNA-Untersuchungen beim NZK auf deren Stabilität und Eignung und beschrieben die RNU48 als stabilste Referenz [165]. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden aufgrund dieser Ergebnisse und deren Verwendung in ähnlichen Untersuchungen die RNU6B und RNU48 als Referenz-miRNA ausgewählt [13, 169, 170].

4.2.2 DIE EXPRESSION DER miRNA 23A IN ABHÄNGIGKEIT DES CASR

Die Expression der miRNA 23a zeigte sich in den Zellklonen CaSR1 und CaSR4 nach Calcium-Aktivierung deutlich gesteigert (Abbildung 15). In dem 786-O-Zellklon CaSR1 war die miRNA 23a-Expression nach Calcium-Behandlung um 39 % höher als in den unbehandelten Zellen, was sich mit den Ergebnissen des Microarrays deckt. CaSR4-Zellen exprimierten die miRNA nach Calcium-Behandlung um 23 % stärker. Dagegen exprimierte CaSR9 die miRNA 23a unabhängig von der Calcium-Aktivierung auf konstantem Niveau. pcDNA3-transfizierte 786-O-Zellen wiesen nach Ca²⁺-Behandlung eine deutliche Abnahme der miRNA 23a-Konzentration um 38 % auf und zeigten ein auffallend hohes Ausgangsniveau (doppelt so hoch wie CaSR1). Auch die WT-Zellen verminderten die miRNA 23a-Expression nach Calcium-Behandlung (33 % Abnahme). Die Behandlung führte somit zu gegensätzlichen Effekten bei den Kontrollzellen (pcDNA3, WT) und den CaSR-transfizierten Zellen CaSR1 und CaSR4. Weiterhin lag die miRNA 23a-Expression in Calcium-behandelten CaSR1-Zellen um 56 % über der in WT-Zellen nach Calcium-Behandlung, analog den Ergebnissen des Microarrays. Derselbe Trend lag auch im Vergleich von CaSR4-Zellen mit WT-Zellen vor.

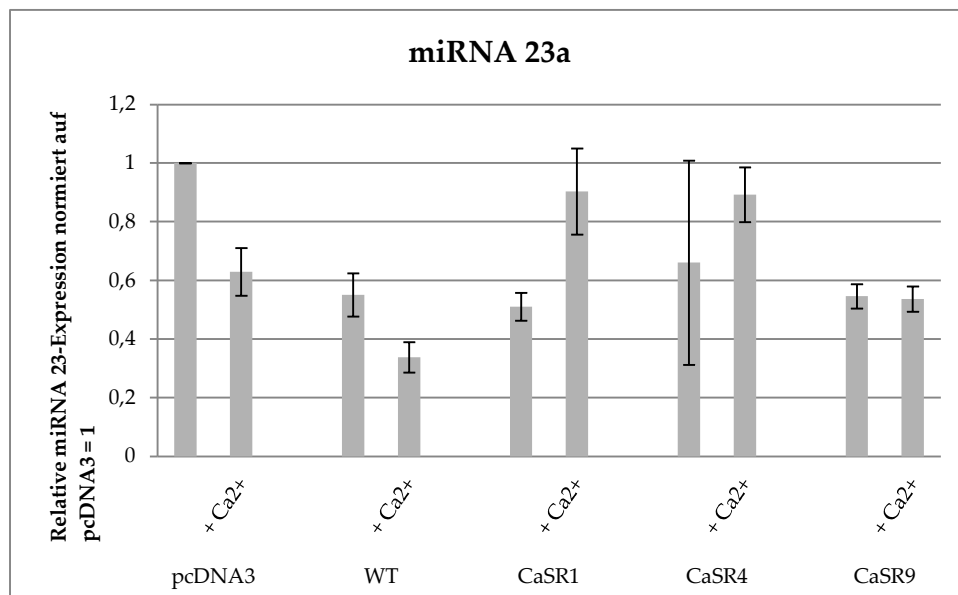


Abbildung 15. Expression der miRNA 23a in den CaSR-Zellklonen CaSR1, CaSR4 und CaSR9 ohne und nach Calcium-Aktivierung (+ Ca²⁺) im Vergleich mit den Kontrollzellen pcDNA3 und WT. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen sowie die Standardabweichung.

4.2.3 DIE EXPRESSION DER miRNA 374b IN ABHÄNGIGKEIT DES CASR

Der Microarray zeigte, dass die miRNA 374b-Expression in WT-Zellen signifikant höher war als die in CaSR1-Zellen. Die qRT-PCR-Ergebnisse bestätigen dies. Hier war die miRNA 374b-Expression in WT-Zellen um 17 % gegenüber CaSR1-Zellen erhöht (Abbildung 16). CaSR4-Zellklone wiesen sogar eine um 59 % verringerte Expression der miRNA im Vergleich zu WT-Zellen auf. Das Expressionsverhalten der miRNA 374b in CaSR-exprimierenden Zellen nach Calcium-Behandlung ließ allenfalls einen leichten Trend erkennen. Die miRNA 374b-Konzentration fiel nach Behandlung der pcDNA3-Zellen mit Ca^{2+} leicht ab (um 13 %). Die WT-786-O-Zellen exprimierten die miRNA 374b unabhängig von Ca^{2+} annähernd gleich. Den größten Effekt zeigte CaSR4 mit einem Anstieg der miRNA 374b-Expression um 28 % nach Calcium-Behandlung. Bei CaSR1 führte diese nur zu einer minimalen miRNA-Expressions-Steigerung, bei CaSR9 zu einem Abfall. Auch der Microarray detektierte keine signifikante Expressionsänderung der miRNA 374b in CaSR1-Zellklonen nach Calcium-Behandlung, sodass die Ergebnisse der qRT-PCR hiermit übereinstimmen.

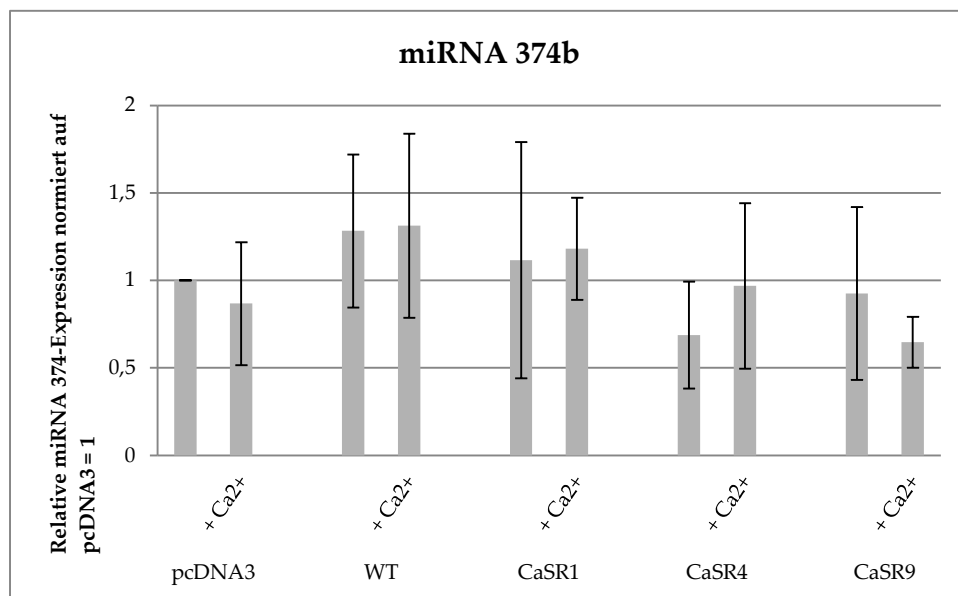


Abbildung 16. Expression der miRNA 374b in den CaSR-Zellklonen CaSR1, CaSR4 und CaSR9 ohne und nach Calcium-Aktivierung (+ Ca^{2+}) im Vergleich mit den Kontrollzellen pcDNA3 und WT. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen sowie die Standardabweichung.

4.2.4 DIE EXPRESSION DER miRNA 181C IN ABHÄNGIGKEIT DES CASR

Die Quantifizierung der miRNA 181c zeigte keine deutlichen Expressionsunterschiede nach Calcium-Behandlung (Abbildung 17). Im Vergleich der eingesetzten Zellen jeweils vor und nach Calcium-Behandlung zeigten sich jeweils annähernd gleiche Expressionslevel, wodurch das Ergebnis des Microarrays nicht validiert werden konnte. Die miRNA 181c-Expressionslevel in WT- und CaSR1-Zellen waren annähernd gleich. Dies deckt sich mit den Microarray-Ergebnissen, in denen sich kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen WT und CaSR1 zeigte. Die Zellklone CaSR1 und CaSR9 wiesen jedoch eine um ca. 60 % verminderte Expression im Vergleich zu WT-Zellen auf.

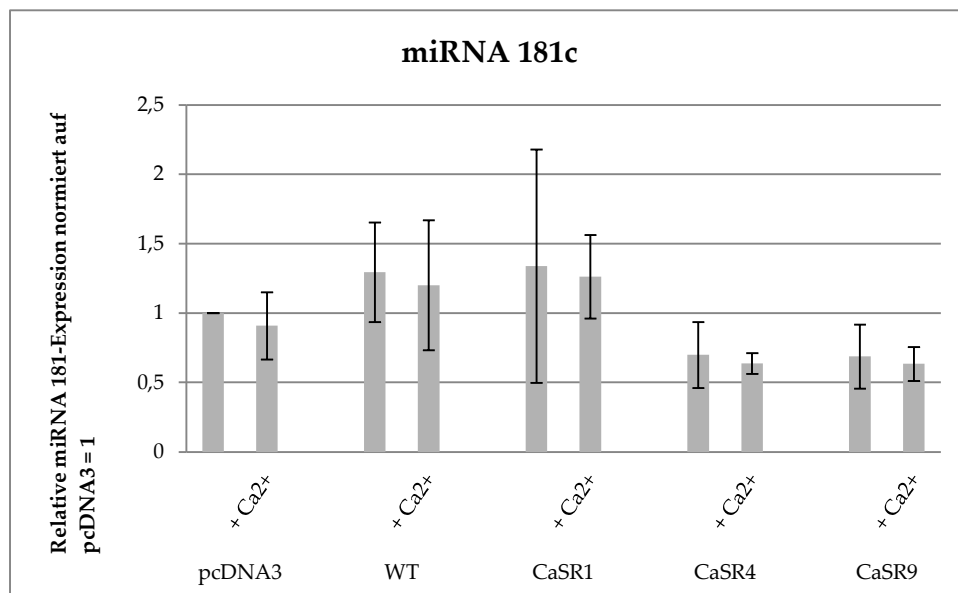


Abbildung 17. Expression der miRNA 181c in den CaSR-Zellklonen CaSR1, CaSR4 und CaSR9 ohne und nach Calcium-Aktivierung (+ Ca²⁺) im Vergleich mit den Kontrollzellen pcDNA3 und WT. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen sowie die Standardabweichung.

4.2.5 DIE EXPRESSION DER miRNA 320C IN ABHÄNGIGKEIT DES CASR

Die 786-O-Klone CaSR1 und CaSR9 exprimierten die miRNA 320c unabhängig von Ca²⁺ etwa konstant, während der Klon CaSR4 ebenso wie die WT-786-O-Zellen nach einer Calcium-Behandlung mit einer minimalen Expressionsminderung reagierten. Die pcDNA3-Zellen wiesen nach einer Calcium-Behandlung sogar eine leichte Expressionssteigerung auf (Abbildung 18). Die Calcium-Behandlung der Zellen schien

somit keinen Effekt auf diese miRNA-Expression zu haben. Jedoch zeigten CaSR-Klone im Vergleich zu WT-Zellen eine insgesamt geringere miRNA-Expression. In CaSR1-Zellen betrug der Expressionsunterschied zu WT-Zellen knapp 10 %, was sich mit den Ergebnissen des Microarrays deckt. Besonders deutlich war dieser miRNA-Expressionsabfall in den 786-O-Zellklonen CaSR4 und CaSR9 sichtbar. Hier lag für CaSR4-Zellen eine um 33 % geringere Expression gegenüber der in WT-Zellen vor und in CaSR9 eine um 22 % geringere.

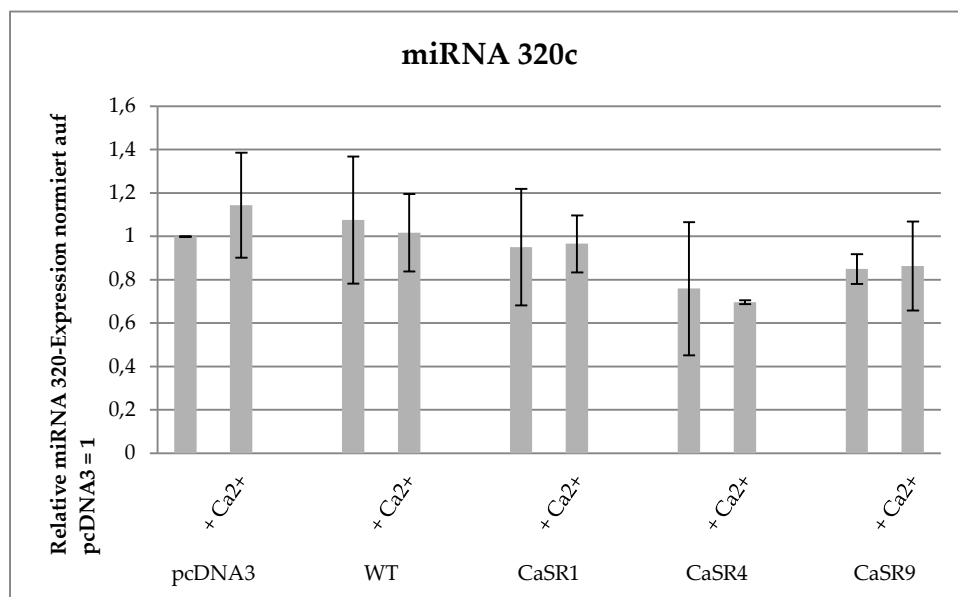


Abbildung 18. Expression der miRNA 320c in den CaSR-Zellklonen CaSR1, CaSR4 und CaSR9 ohne und nach Calcium-Aktivierung (+ Ca²⁺) im Vergleich mit den Kontrollzellen pcDNA3 und WT. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen sowie die Standardabweichung.

4.2.6 DIE EXPRESSION DER MIRNA 424 IN ABHÄNGIGKEIT DES CASR

Die Auswertungen der miRNA 424-Expressionen ergaben keine deutlichen Konzentrationsunterschiede nach Calcium-Behandlung der einzelnen CaSR-Zellklone (Abbildung 19). Die 786-O-Klone CaSR1 und CaSR4 zeigten nach der Calcium-Behandlung einen leichten Trend zur miRNA 424-Zunahme. Der Klon CaSR9 zeigte nach der Calcium-Behandlung dagegen eine leichte Abnahme der miRNA 424-Expression ebenso wie die Kontrollzellen (Abbildung 19). Der signifikante miRNA 424-Expressionsunterschied zwischen WT- und CaSR1-Zellen, den der Microarray zeigte, konnte durch die qRT-PCR nicht bestätigt werden. WT-Zellen und CaSR1-Zellen exprimierten die miRNA in annähernd gleichem Maß. Ein deutlicher

Expressionsunterschied bestand jedoch zwischen WT-Zellen und den Zellklonen CaSR4 und CaSR9. Dabei war die miRNA 424-Expression in WT-Zellen doppelt so hoch wie in CaSR4-Zellen und 2,8-fach so hoch wie in CaSR9-Zellen.

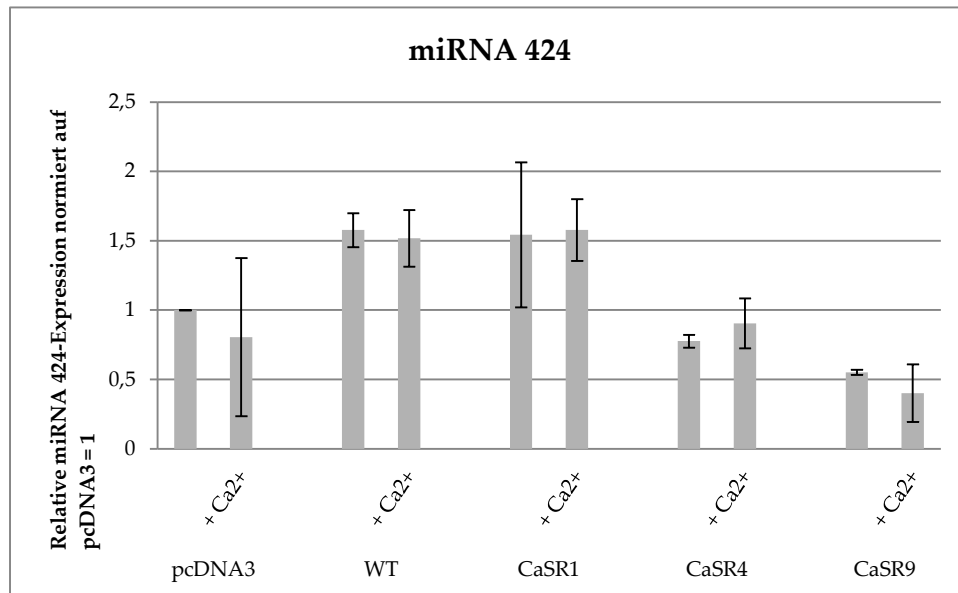


Abbildung 19. Expression der miRNA 424 in den CaSR-Zellklonen CaSR1, CaSR4 und CaSR9 ohne und nach Calcium-Aktivierung ($+ Ca^{2+}$) im Vergleich mit den Kontrollzellen pcDNA3 und WT. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen sowie die Standardabweichung.

Da in den qRT-PCR-Analysen die Effekte bezüglich der miRNA 23a-Expressionsunterschiede bei CaSR-Zellen nach Calcium-Behandlung am deutlichsten waren und sich diese Ergebnisse mit denen der Microarray-Expressionsanalyse deckten, wurden die weiteren Experimente dieser Arbeit auf die Untersuchung der miRNA 23a beschränkt.

4.3 DAS EXPRESSIONSVERHALTEN DER MIRNA 23A NACH HEMMUNG DES CASR

Die vorigen Ergebnisse zeigten, dass in CaSR-transfizierten Zellen eine verstärkte Expression an miRNA 23a vorlag und diese nach Aktivierung des Rezeptors durch Ca^{2+} weiter verstärkt wurde. Nun stellte sich die Frage, ob dieser miRNA 23a-Expressionsanstieg durch den CaSR und dessen Aktivierung selbst, oder durch andere unbekannte Faktoren verursacht wurde. Bei NPS2143 handelt es sich um einen allosterischen Inhibitor des CaSR. Er wurde eingesetzt, um den Rezeptor zu hemmen und zu prüfen, ob hieraus eine verminderte miRNA 23a-Expression im Vergleich zu ungehemmten

CaSR-Zellen resultiert. Für die Versuche wurden die Klone der 786-O-Zellen pcDNA3, WT, CaSR1 und CaSR4 eingesetzt und jeweils auf drei unterschiedliche Varianten behandelt: mit Ca^{2+} (30 min, 10 mM), mit NPS2143 (1 h, 10 μM) und mit NPS2143 + Ca^{2+} (1 h, 10 μM und 30 min, 10 mM). Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse zeigten bei Normierung auf pcDNA3 = 1 deutlich, dass die miRNA 23a-Expressionslevel der pcDNA3- und WT-Zellen unabhängig ihrer Behandlungsform niedrig und annähernd gleichbleibend waren (Abbildung 20). Dagegen fiel besonders bei dem Klon CaSR1 eine erhöhte miRNA 23a-Ausgangsexpression auf, die durch Calcium-Behandlung deutlich anstieg und damit die Ergebnisse aus Abschnitt 4.2.2 bestätigte. Nach einer NPS2143-Behandlung zeigten die Zellen eine ähnliche Expression wie der unbehandelte CaSR1-Klon. Bei zusätzlicher Calcium-Behandlung zeigten die CaSR1-Zellen schließlich eine deutlich geringere miRNA 23a-Expressionssteigerung im Vergleich zu den CaSR1-Zellen, welche nur mit Calcium behandelt wurden. Die CaSR4-Zellen zeigten denselben Effekt in geringerer Ausprägung (Abbildung 20). Die Steigerung nach Calcium-Behandlung lag bei CaSR1 bei Faktor 3,4 und bei CaSR4 bei Faktor 2,4. Dagegen war die Steigerung nach NPS2143-Behandlung geringer und lag bei Faktor 1,9 für CaSR1 und Faktor 1,6 für CaSR4.

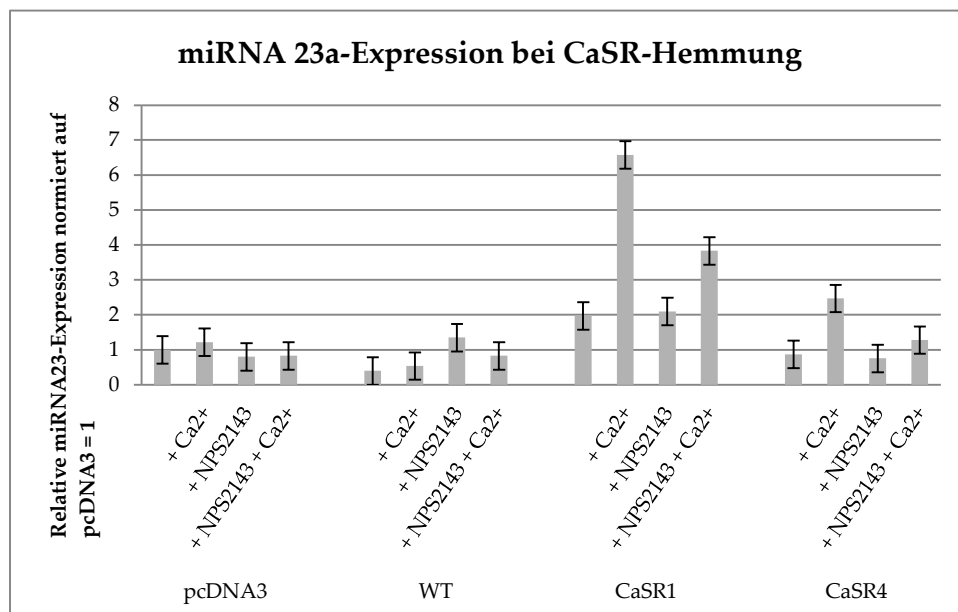


Abbildung 20. Die miRNA 23a-Expression bei Hemmung des CaSR im Vergleich von pcDNA3-, WT-, CaSR1- und CaSR4-Zellen. Für die Untersuchung wurden jeweils unbehandelte, mit Calcium behandelte (30 min, 10 mM), mit NPS2143 behandelte (1 h, 10 μM), sowie mit NPS2143 + Ca^{2+} (1 h, 10 μM und 30 min, 10 mM) behandelte Zellen gegenübergestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen sowie die Standardfehler.

4.4 ETABLIERUNG DER TRANSFEKTION VON CASR-ZELLEN MIT DEM miRNA 23A-INHIBITOR

Nachdem die Hemmung des CaSR einen miRNA 23a-Expressionsabfall zeigte, sollte geprüft werden, inwiefern sich CaSR und miRNA 23a gegenseitig regulieren. Im Folgenden wurde deshalb untersucht, ob Eigenschaften, die bezüglich der Knochenmetastasierung mit dem CaSR in Zusammenhang gebracht wurden, tatsächlich auf die CaSR-abhängig veränderte miRNA 23a-Regulation zurückgeführt werden können. Hierzu sollte untersucht werden, welche Auswirkungen das Ausschalten der miRNA 23a in CaSR-Zellen induziert. Zunächst wurde dafür die miRNA 23a-Expression in dem CaSR1-Zellklon durch die Transfektion mit einem miRNA 23a-Inhibitor gehemmt. miRNA-Inhibitoren sind kleine einzelsträngige RNA-Moleküle, die spezifisch an endogene miRNA binden und deren Degradierung induzieren. Gleichzeitig wurde als Kontrolle eine *mirVana* miRNA Inhibitor *Negative Control* (Negativkontrolle) mitgeführt. Um die optimalen Transfektionsbedingungen zu ermitteln, wurden zunächst Zellen mit dem Inhibitor transfiziert und für 24 h sowie 48 h inkubiert. Nach 23,5 h bzw. 47,5 h erfolgte bei der Hälfte der Zellen die Inkubation für 30 min mit 10 mM Calcium. Insgesamt ergaben sich dadurch die in Tabelle 23 angegebenen Behandlungen:

Tabelle 23. Transfektionsproben. Die CaSR1-Zellen wurden unbehandelt, mit miRNA 23a-Inhibitor transfiziert und mit Negativkontrolle transfiziert hergestellt. Diese wurden wiederum jeweils ohne und mit Ca²⁺-Behandlung (30 min, 10 mM) eingesetzt.

Inkubationszeit	Transfektions-Behandlung
24 h	unbehandelt
	unbehandelt + 10 mM Calcium (30 min Inkubation)
	Inhibitor
	Inhibitor + 10 mM Calcium (30 min Inkubation)
	Negativkontrolle (Neg)
	Negativkontrolle + 10 mM Calcium (30 min Inkubation)
48 h	unbehandelt
	unbehandelt + 10 mM Calcium (30 min Inkubation)
	Inhibitor
	Inhibitor + 10 mM Calcium (30 min Inkubation)
	Negativkontrolle
	Negativkontrolle + 10 mM Calcium (30 min Inkubation)

Der Transfektionserfolg wurde mittels qRT-PCR überprüft. Dazu wurden die Proben jeweils in Tripletts gemessen, gemittelt, auf die Standardreihe bezogen und die

Ergebnisse auf das Geo-Mittel der Standard-miRNA normiert. Zur besseren graphischen Veranschaulichung wurden die Ergebnisse auf unbehandelte Zellen (weder mit Inhibitor noch mit Negativkontrolle transfiziert) normiert (Abbildung 21). Sowohl nach 24 h als auch nach 48 h Inkubation der Transfektion wiesen die Zellen keine miRNA 23a-Expression mehr auf, sodass die Transfektion erfolgreich war. Auch durch Aktivierung des CaSR mit Ca^{2+} war kein Expressionsanstieg mehr zu verzeichnen. Dagegen zeigten sowohl die Negativkontrollen als auch die unbehandelten Zellen (n.b.) eine deutliche miRNA 23a-Expression, die wie erwartet nach Calcium-Behandlung stieg. Da bereits nach 24 h Inkubation eine effiziente miRNA 23a-Hemmung nachgewiesen werden konnte, wurden die nachfolgenden Transfektionen für weitere Versuche unter diesen Bedingungen durchgeführt.

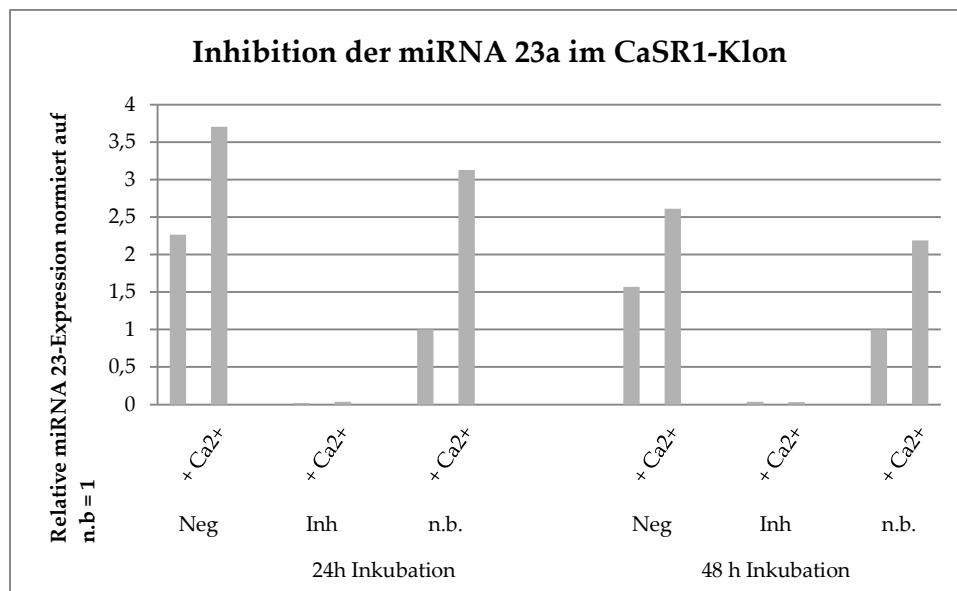


Abbildung 21. miRNA 23a-Expression nach Transfektion von CaSR1-Zellen mit miRNA 23a-Inhibitor (Inh) in Abhängigkeit einer Calcium-Behandlung. Die Inkubation der Zellen mit Transfektionsreagenzien wurde für 24 h und 48 h vorgenommen. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Zellen (n.b.) und mit Negativkontrolle (Neg) transfizierte Zellen herangezogen.

4.5 EINFLUSS DER MIRNA 23A UND DES CASR AUF ZELLULÄRE PROZESSE

Bricht ein invasiver Tumor ins Blutgefäß- oder Lymphsystem ein, kommt es zu einer Verstreuung der Tumorzellen in ein Sekundärorgan. Dort können unter geeigneten Bedingungen Mikro- und später Makrometastasen entstehen. Dazu muss eine Vermehrung (Proliferation) der Tumorzellen stattfinden. Im Folgenden wurde untersucht, ob die miRNA 23a-Expression einen Effekt auf das Proliferationsverhalten

sowie die Zellviabilität und Toxizität der NZK-Zellen aufweist. In unserer Forschungsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass Calcium-behandelte CaSR1-, CaSR4- und CaSR9-Zellklone eine stärkere Proliferation aufweisen als unbehandelte CaSR-exprimierende Zellen oder WT-Zellen [11]. Nun sollte untersucht werden ob dieses verstärkte Proliferationsverhalten möglicherweise durch das erhöhte miRNA 23a-Expressionslevel in Calcium-behandelten CaSR-Klonen zustande kommt.

Dazu wurde ein Vergleich der Zellproliferation, Viabilität und Toxizität von pcDNA3-, WT-, CaSR1- und CaSR4-Zellen nach unterschiedlichen Behandlungen untersucht: mit miRNA 23a-Inhibitor, mit der Negativkontrolle, und unbehandelte Zellen (ohne Inhibitor- oder Negativkontrolle-Transfektion). Diese drei Behandlungsformen wurden wiederum jeweils ohne und mit Calcium-Behandlung (10 mM, 30 min) verglichen, die unmittelbar nach der zweiten Messung zum Zeitpunkt t_1 erfolgte.

4.5.1 EINFLUSS AUF DIE ZELLVIABILITÄT

Die Zellviabilität wurde zunächst mit Hilfe des *RealTime Glo Cell Viability Assays* untersucht, der sich das Redoxpotential vitaler Zellen zu Nutze macht. Ein dabei eingesetztes metabolisches Substrat wird intrazellulär reduziert und von der Luciferase ATP-abhängig umgesetzt. Dabei gibt diese ein Biolumineszenzsignal ab, das mit der Zellviabilität korreliert. Verglichen wurden die Zellklone CaSR1 und CaSR4 mit den Kontrollzellen pcDNA3 und WT. Es wurde beginnend mit dem Zeitpunkt t_0 alle 30 min gemessen. Die Fluoreszenzergebnisse wurden auf den Zeitpunkt $t_1 = 1$ normiert.

Die CaSR-786-O-Zellen zeigten keinen deutlichen Unterschied im Vergleich mit den Kontrollzellen WT und pcDNA3 (Abbildung 22 - Abbildung 25). Die miRNA 23a-inhibierten Zellen proliferierten sowohl in den WT- und pcDNA3-Zellen als auch in den CaSR-exprimierenden Zellen etwas geringer.

pcDNA3-Zellen zeigten bei Transfektion mit miRNA 23a-Inhibitor ohne und nach Calcium-Aktivierung über die gesamte Messdauer die geringste Zellviabilität, die annähernd gleich war (Abbildung 22). Eine leicht höhere Viabilität wiesen pcDNA3-Zellen, die weder mit miRNA 23a-Inhibitor noch mit der Negativkontrolle transfiziert

waren, ohne und nach Calcium-Behandlung auf. Auch hier zeigte sich kein Effekt durch die Calcium-Behandlung. Mit Negativkontrolle transfizierte pcDNA3-Zellen wiesen wiederum eine leicht höhere Viabilität auf und zeigten keine Änderung in der Ca²⁺-behandelten Form.

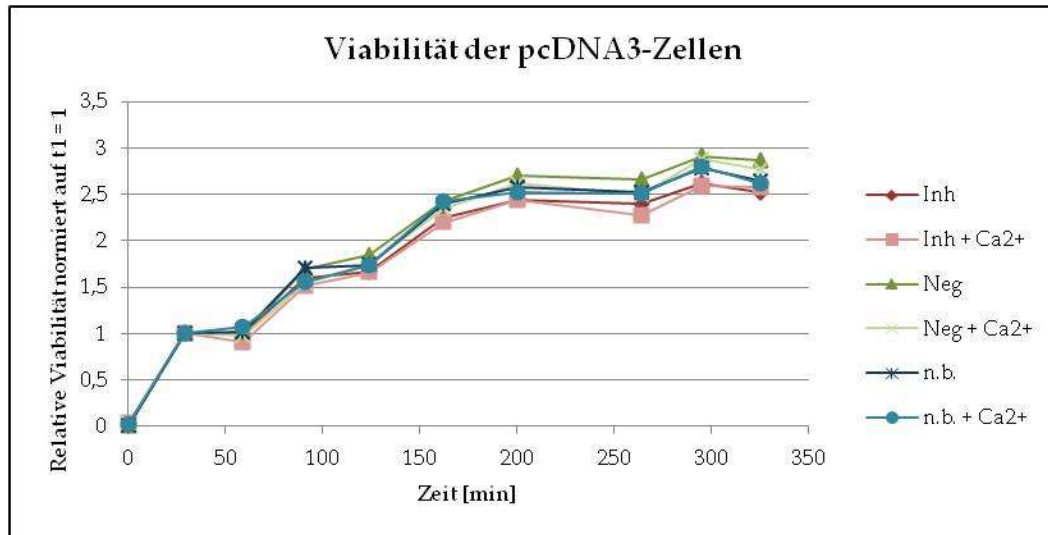


Abbildung 22. Relative Viabilität der pcDNA3-Zellen in den unterschiedlichen Behandlungsformen: miRNA 23a-Inhibitor (Inh), miRNA 23a-Inhibitor + Ca²⁺ (Inh + Ca²⁺), Negativkontrolle (Neg), Negativkontrolle + Ca²⁺ (Neg + Ca²⁺), unbehandelt (n.b.) und unbehandelt + Ca²⁺ (n.b. + Ca²⁺).

In WT-Zellen war die Viabilität der miRNA 23a-inhibierten Zellen ebenfalls die geringste (Abbildung 23). Nach Calcium-Behandlung blieb die Zellviabilität gleich. Ähnlich stark proliferierten mit Negativkontrolle transfizierte, Calcium-behandelte WT-Zellen. Eine minimale Viabilitätssteigerung zeigten dazu im Vergleich unbehandelte WT-Zellen ohne und nach Calcium-Zugabe. Wiederum minimal erhöht war dagegen die Viabilität der Negativkontrolle-transfizierten Zellen.

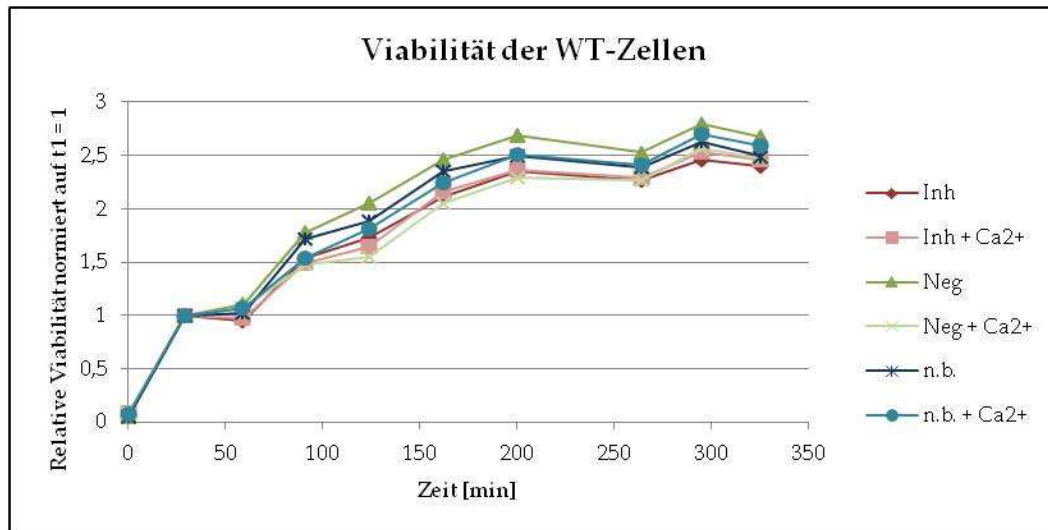


Abbildung 23. Relative Viabilität der WT-Zellen in den unterschiedlichen Behandlungsformen: miRNA 23a-Inhibitor (Inh), miRNA 23a-Inhibitor + Ca²⁺ (Inh + Ca²⁺), Negativkontrolle (Neg), Negativkontrolle + Ca²⁺ (Neg + Ca²⁺), unbehandelt (n.b.) und unbehandelt + Ca²⁺ (n.b. + Ca²⁺).

Der CaSR1-Zellklon zeigte bei inhibierter miRNA 23a und nach Calcium-Behandlung die geringste Zellviabilität (Abbildung 24), wobei die Zellviabilität ohne Calcium-Behandlung bis t_8 höher war. Eine ähnliche Viabilität zeigten unbehandelte CaSR1-Zellen sowie mit Negativkontrolle transfizierte CaSR1-Zellen jeweils nach Calcium-Behandlung. Ohne Calcium-Behandlung wiesen sie jeweils eine leicht höhere Zellviabilität auf.

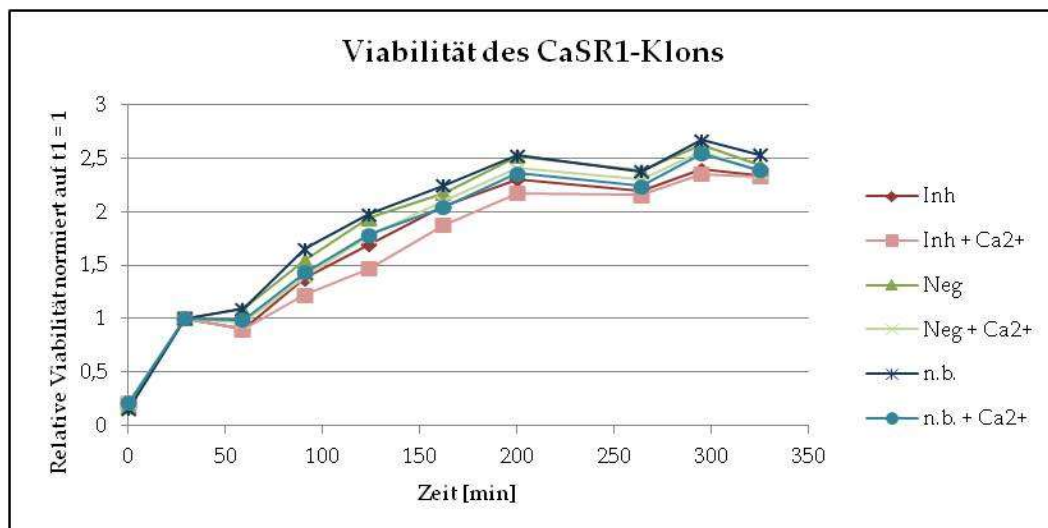


Abbildung 24. Relative Viabilität des CaSR1-Klons in den unterschiedlichen Behandlungsformen: miRNA 23a-Inhibitor (Inh), miRNA 23a-Inhibitor + Ca²⁺ (Inh + Ca²⁺), Negativkontrolle (Neg), Negativkontrolle + Ca²⁺ (Neg + Ca²⁺), unbehandelt (n.b.) und unbehandelt + Ca²⁺ (n.b. + Ca²⁺).

Einen deutlichen Unterschied in Form einer geringeren Zellviabilität zeigten im CaSR4-Zellklon die Calcium-aktivierten Formen der miRNA 23a-inhibierten, der unbehandelten und der Negativkontrolle-transfizierten Zellen im Vergleich zu den Formen ohne Calcium-Behandlung (Abbildung 25). Insgesamt war die Zellviabilität der miRNA 23a-inhibierten CaSR4-Zellen nach Calcium-Behandlung die geringste.

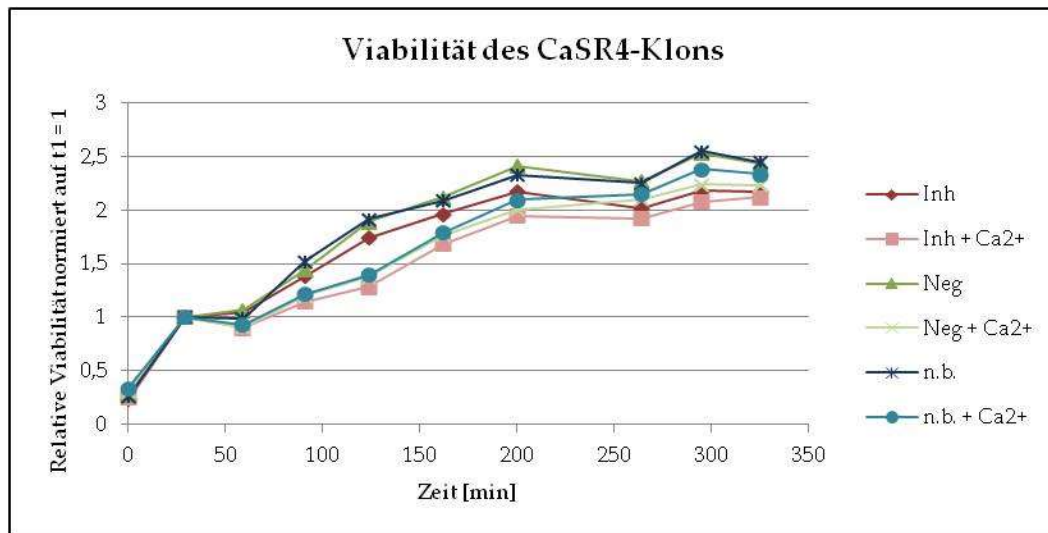


Abbildung 25. Relative Viabilität der CaSR4-Klone in den unterschiedlichen Behandlungsformen: miRNA 23a-Inhibitor (Inh), miRNA 23a-Inhibitor + Ca²⁺ (Inh + Ca²⁺), Negativkontrolle (Neg), Negativkontrolle + Ca²⁺ (Neg + Ca²⁺), unbehandelt (n.b.) und unbehandelt + Ca²⁺ (n.b. + Ca²⁺).

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden zu einem festen Messzeitpunkt (t₄) die Viabilitätsergebnisse aller Zellen in einem Balkendiagramm gegenübergestellt (Abbildung 26). Darin zeigten miRNA 23a-inhibierte CaSR1- und CaSR4-Zellen eine geringere Viabilität als die jeweiligen Negativkontrollen und die Zellen, die weder mit dem Inhibitor noch der Negativkontrolle transfiziert waren. Es kam zu einer Abnahme der Viabilität um 13 % bei miRNA 23a-inhibierten CaSR1-Zellklonen im Vergleich mit der Negativkontrolle und um eine Abnahme von 17 % nach zusätzlicher Calcium-Behandlung. Bei CaSR4-Zellen betrug die Abnahme bei miRNA 23a-Inhibition 9 % gegenüber der Negativkontrolle und 6 % nach Calcium-Behandlung. Auch im Vergleich mit den Kontrollzellen WT und pcDNA3 fiel diese geringer aus. Eine Calcium-Behandlung führte zu einer leichten Viabilitätsabnahme in den 786-O-Zellklonen CaSR1 und CaSR4 (Abbildung 26).

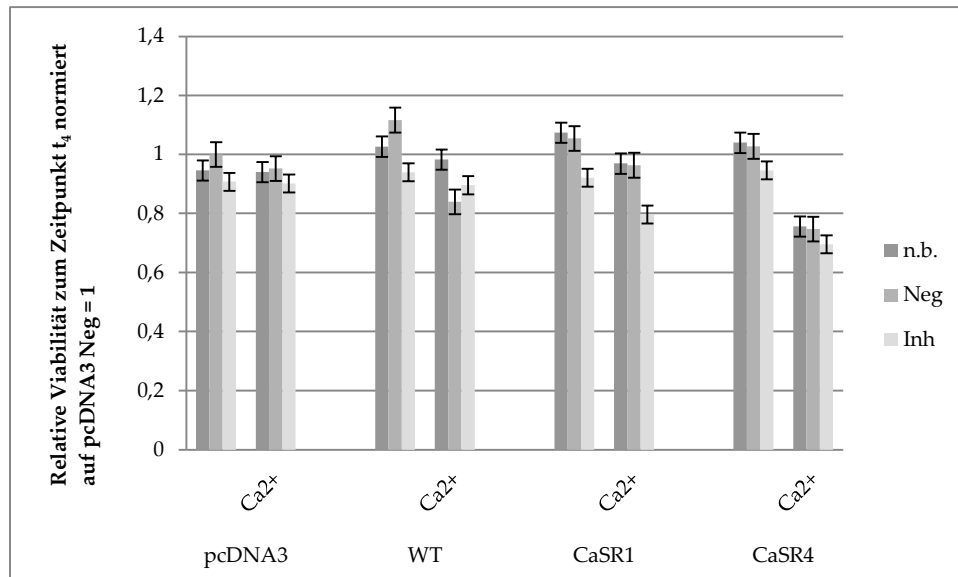


Abbildung 26. Relative Viabilität der pcDNA3-, WT-, CaSR1- und CaSR4-Zellen zum Zeitpunkt t_4 in unterschiedlichen Behandlungsformen: unbehandelt (n.b.), unbehandelt + Ca^{2+} (n.b. + Ca^{2+}), Negativkontrolle (Neg), Negativkontrolle + Ca^{2+} , miRNA 23a-Inhibitor (Inh), miRNA 23a-Inhibitor + Ca^{2+} (Inh + Ca^{2+}).

4.5.2 EINFLUSS AUF DIE TOXIZITÄT

Die Detektion der Fluoreszenz mittels des *CellTox Green Cytotoxicity* -Assays sollte aufzeigen, ob die Transfektion und Behandlungen toxisch auf die 786-O-Klone wirkten. Dabei werden Änderungen der Integrität der Zellmembran detektiert, die als Folge von Zelluntergang resultieren. Das Fluoreszenzsignal kommt durch eine Cyaninsonde zustande, die nur in geschädigte Zellmembranen eindringen kann und bei Bindung an DNA ein Fluoreszenzsignal auslöst. Es wurde parallel zur Zellviabilitätsmessung beginnend mit dem Zeitpunkt t_2 nach Calcium-Behandlung alle 30 min gemessen. Die Fluoreszenzergebnisse wurden auf den Zeitpunkt $t_2 = 1$ normiert.

Alle eingesetzten Zellen zeigten über den Messzeitraum konstante Werte (Abbildung 27 - Abbildung 30). Somit ist nicht von einer Toxizität des Assays auf die Zellen auszugehen.

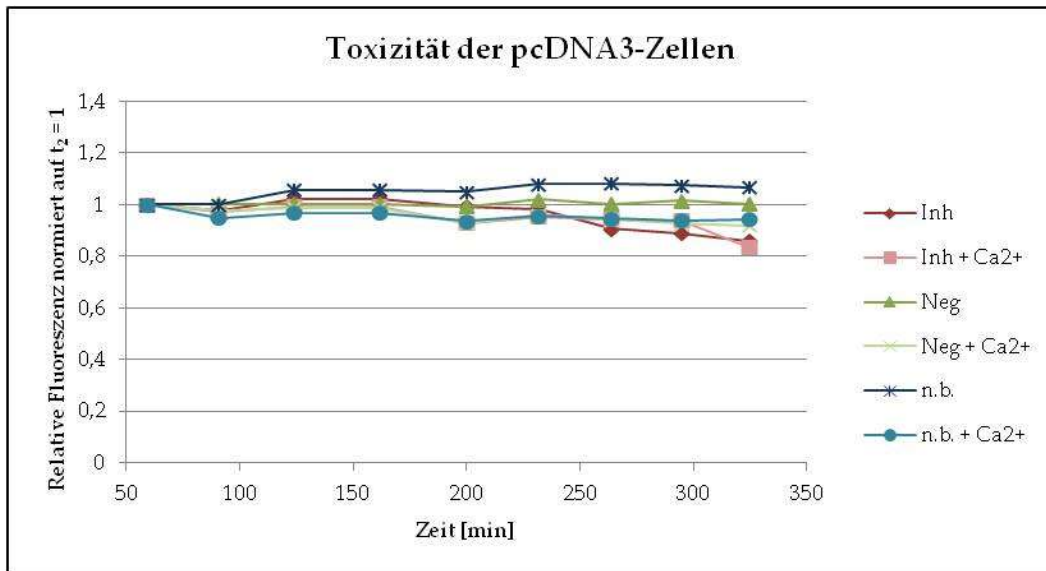


Abbildung 27. Relative Toxizität der pcDNA3-Zellen in den unterschiedlichen Behandlungsformen: miRNA 23a-Inhibitor (Inh), miRNA 23a-Inhibitor + Ca²⁺ (Inh + Ca²⁺), Negativkontrolle (Neg), Negativkontrolle + Ca²⁺ (Neg + Ca²⁺), unbehandelt (n.b), unbehandelt + Ca²⁺ (n.b. + Ca²⁺).

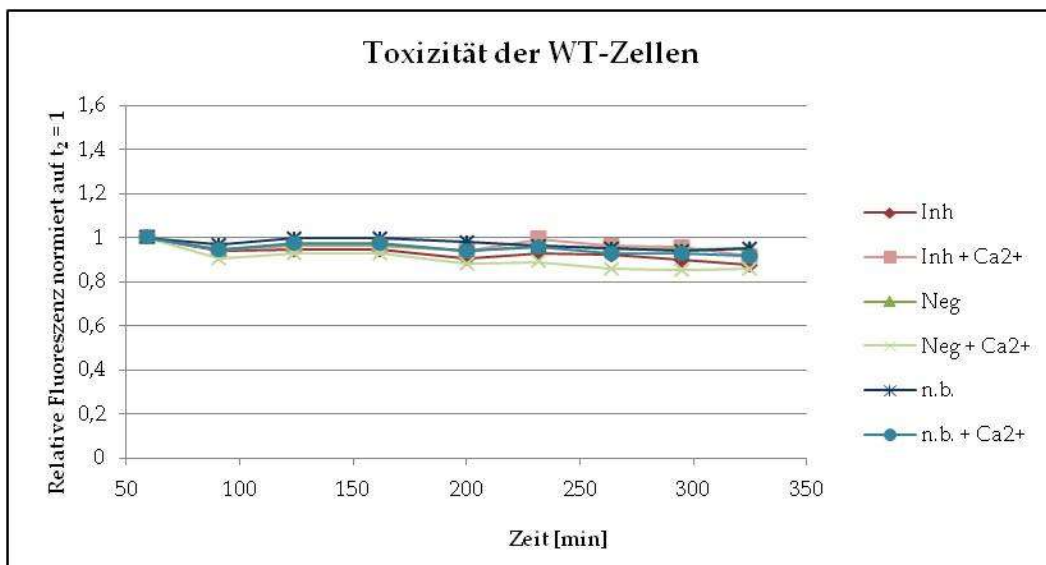


Abbildung 28. Relative Toxizität der WT-Zellen in den unterschiedlichen Behandlungsformen: miRNA 23a-Inhibitor (Inh), miRNA 23a-Inhibitor + Ca²⁺ (Inh + Ca²⁺), Negativkontrolle (Neg), Negativkontrolle + Ca²⁺ (Neg + Ca²⁺), unbehandelt (n.b), unbehandelt + Ca²⁺ (n.b. + Ca²⁺).

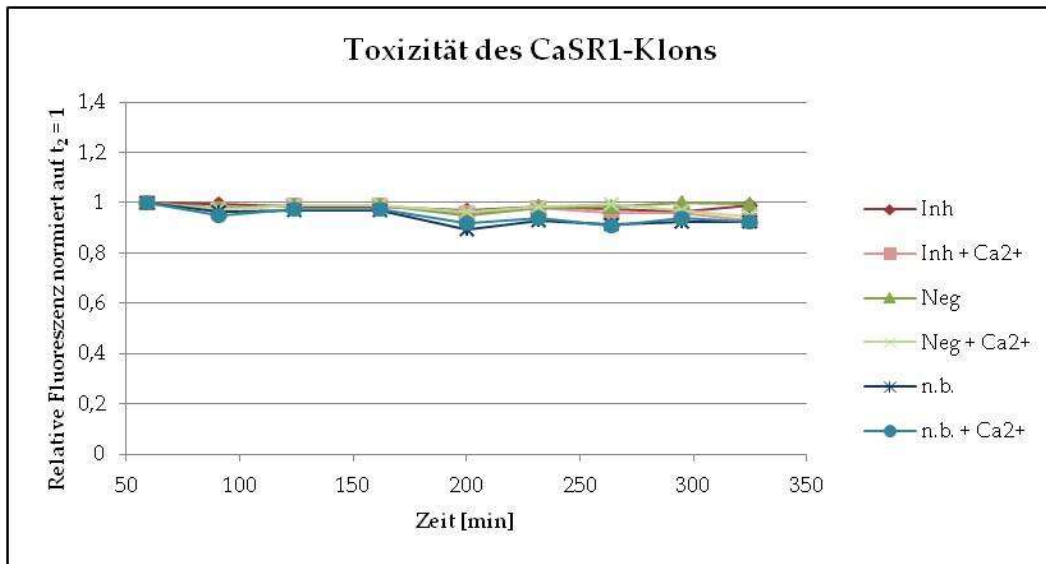


Abbildung 29. Relative Toxizität des CaSR1-Klons in den unterschiedlichen Behandlungsformen: miRNA 23a-Inhibitor (Inh), miRNA 23a-Inhibitor + Ca²⁺ (Inh + Ca²⁺), Negativkontrolle (Neg), Negativkontrolle + Ca²⁺ (Neg + Ca²⁺), unbehandelt (n.b), unbehandelt + Ca²⁺ (n.b. + Ca²⁺).

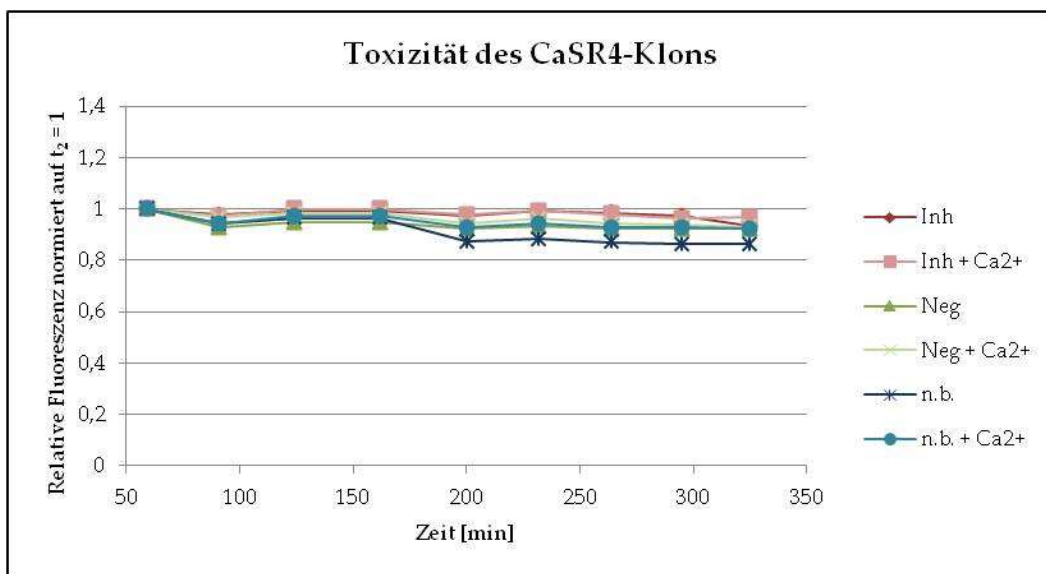


Abbildung 30. Relative Toxizität des CaSR4-Klons in den unterschiedlichen Behandlungsformen: miRNA 23a-Inhibitor (Inh), miRNA 23a-Inhibitor + Ca²⁺ (Inh + Ca²⁺), Negativkontrolle (Neg), Negativkontrolle + Ca²⁺ (Neg + Ca²⁺), unbehandelt (n.b), unbehandelt + Ca²⁺ (n.b. + Ca²⁺).

4.5.3 EINFLUSS AUF DIE PROLIFERATION

Der BrdU-Assay basiert auf der Inkorporation von BrdU an Stelle von Thymidin in die DNA. Der Assay wurde mit WT-, pcDNA3-, CaSR1- und CaSR4-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden jeweils unbehandelt (ohne Inhibitor oder Negativkontrolle), miRNA 23a-inhibiert und mit Negativkontrolle transfiziert eingesetzt und jeweils ohne und nach

Calcium-Behandlung verglichen. Jede Probe wurde für die Messung als Triplet angelegt. Außerdem wurde der gesamte Proliferations-Assays zweimal durchgeführt.

Es zeigte sich eine Proliferationsabnahme der CaSR4-Zellen durch die miRNA 23a-Inhibition um 14 % im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 31). Nach einer Ca²⁺-Behandlung betrug die Reduktion der Proliferationsrate 22 % und war im Vergleich zur Negativkontrolle stärker.

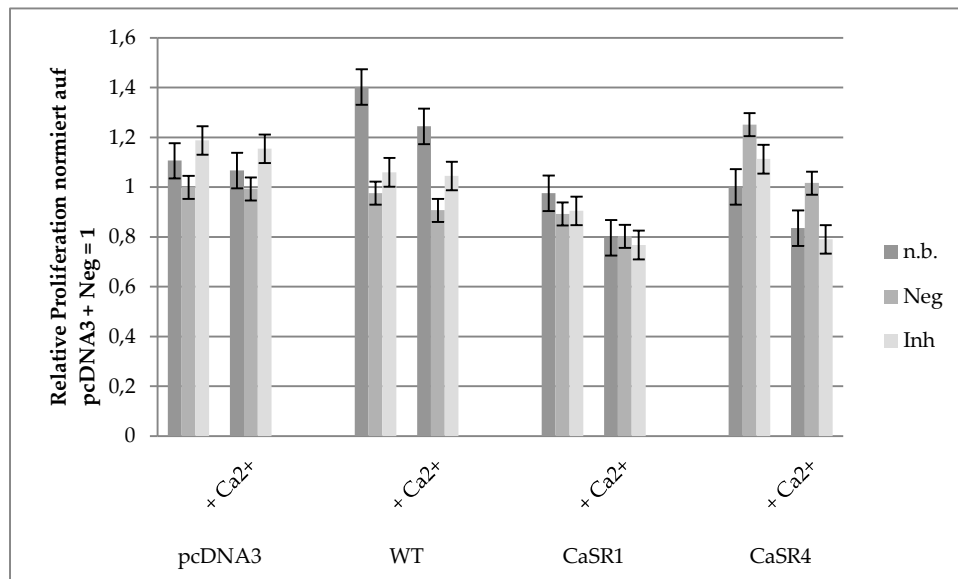


Abbildung 31. Das Proliferationsverhalten von CaSR-exprimierenden Zellen bei miRNA 23a-Inhibition ohne und mit Calcium-Behandlung (Ca²⁺). Als Kontrollzellen dienten pcDNA3- und WT-Zellen. Eingesetzt wurden jeweils die Behandlungsformen unbehandelt (n.b.), die Negativkontrolle und miRNA 23a-inhibierte Zellen. Die Ergebnisse wurden auf pcDNA3 + Neg. normiert und gemittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen sowie die Standardfehler.

Die pcDNA3-Zellen zeigten keine Proliferationsabnahme nach Inhibierung der miRNA 23a auf. Es kam jedoch zu einer Steigerung der Proliferationsrate sowohl in den Ca²⁺-unbehandelten als auch in den Ca²⁺-behandelten Zellen um maximal 18 % im Vergleich zu mit Negativkontrolle transfizierten pcDNA3-Zellen. Die Proliferation der pcDNA3-Zellen, die weder miRNA 23a-inhibiert noch mit Negativkontrolle transfiziert waren, war im Vergleich zu den Negativkontrollen nur minimal erhöht. Ebenso zeigten die WT-Zellen eine leicht gesteigerte Proliferationsrate nach Hemmung der miRNA 23a im Vergleich zu den mit Negativkontrolle transfizierten WT-Zellen. Die Ca²⁺-Behandlung hatte in diesen Zellen dagegen keinen Effekt. Die Proliferation unbehalteter WT-Zellen war höher als in den mit Negativkontrolle transfizierten WT-Zellen (um 43 %) und nahm

durch Calcium-Behandlung ab. Die CaSR1-Zellen proliferierten nach Calcium-Behandlung und miRNA 23a-Inhibition nur in minimalem Ausmaß geringer als die Negativkontrolle.

5 DISKUSSION

Zur Untersuchung, ob der CaSR einen Einfluss auf die Expression bestimmter miRNA hat und diese an einer knochenspezifischen Metastasierung beteiligt sind, wurden zunächst mit Hilfe der miRNA-Expressionsanalyse Unterschiede in der miRNA-Expression im Vergleich von CaSR-Klonen und WT-Zellen jeweils ohne und mit Calciumbehandlung mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ detektiert. Dies führte unter anderem zur Identifikation von 24 miRNA, die in CaSR1-Zellen nach Calcium-Behandlung eine signifikante Expressionsänderung im Vergleich mit unbehandelten Zellen aufwiesen. In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass der CaSR am Prozess der knochenspezifischen Metastasierung des NZK beteiligt ist und es wurden gezielt CaSR-transfizierte Zellen hergestellt. Diese können als Modell für NZK-Zellen, die verstärkt in Knochen metastasieren, betrachtet werden. Sie zeigten in Zellassays eine stärkere Calcium-induzierte Adhäsion, Migration und Proliferation als WT-Zellen [155]. Dies stimmt mit den Untersuchungen an primären NZK-Zellen überein, die Knochenmetastasen ausbildeten und verstärkt den CaSR exprimierten [10, 11]. Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten miRNA identifiziert werden, die in CaSR-Klonen im Vergleich zu WT-Zellen verändert exprimiert waren und im Zusammenhang mit dem CaSR und der Knochenmetastasierung stehen könnten, wobei sich insbesondere die miRNA 23a als relevant hierfür zeigte.

5.1 DIE MIRNA 23A

Die miRNA 23 wird auf dem Chromosom 19 codiert. In den letzten Jahren beschrieben zahlreiche Publikationen für diverse Tumorentitäten und Metastasierungsprozesse veränderte miRNA 23a-Expressionslevel, wie auch der Isoform miRNA 23b [13, 131, 171-173]. Petillo *et al.* zeigten bereits, dass miRNA-Profile nicht nur in Tumoren unterschiedlicher anatomischer Lokalisationen variieren, sondern auch in multiplen Tumorsubtypen einer Lokalisation, wie zum Beispiel im NZK [141]. So werden auch bezüglich der Beteiligung der miRNA 23a an der Entstehung verschiedener

Tumorentitäten unterschiedliche mögliche Signalwege diskutiert. Mehrere Veröffentlichungen beschreiben eine Überexpression und Beteiligung der miRNA 23a am Tumorwachstum des Magenadenokarzinoms, wobei unterschiedliche Signalfunktionen gezeigt wurden: über Targetbindung an *Interferon regulatory factor 1* (IRF1), durch Bindung an Metallothionin 2A (MT2A), durch Bindung und Herabregulation des Interleukin 6-Rezeptors und durch Hemmung der E-Cadherin-Expression sowie Regulation durch einen Komplex aus *activator protein 1* (AP1) und *nuclear factor of activated T-cells 4* (NFAT4) [27, 174-176].

Im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (*non small cell lung cancer* = NSCLC) verstärkt die miRNA 23a die Migration und Invasion der malignen Zellen, indem sie das Insulin Rezeptor Substrat (IRS1) bindet [177]. Das Gliomwachstum wird durch Fehlregulation des *cAMP response element binding protein* (creb) mit der miRNA 23a gefördert [178]. In Kolonkarzinomen wurde ein wachstums- und metastasierungsfördernder Effekt der miRNA über den *metastasis suppressor 1* (MTSS1) beschrieben [179].

Besonderes Interesse gilt aber den bisherigen Ergebnissen bezüglich der Rolle der miRNA 23a im klarzelligen NZK. Kürzlich berichteten Quan *et al.* von einer signifikanten Überexpression der miRNA 23a in NZK-Gewebe gegenüber der Expression in gesundem Nierengewebe ($p < 0,01$) [180]. Ebenso zeigten 786-O-Zellen diesen Effekt im Vergleich mit der humanen Embryo-Nierenzelllinie 293-T. In Zellassays gingen mit dieser Überexpression eine verstärkte Proliferation, Migration, Invasion und Hemmung der Zellapoptose einher. Die Ergebnisse konnten durch Hemmung der miRNA verifiziert werden. Auch Petillo *et al.* wiesen eine verstärkte miRNA 23a-Expression in NZK-Zellen nach [141]. Heinzelmann *et al.* verglichen primäre NZK-Zellen aus dem Tumorgewebe nephrektomierter Patienten mit oder ohne Metastasen. Dabei war die miRNA 23a in NZK-Zellen aus metastasiertem Tumorgewebe im Vergleich zu solchen aus unmetastasierten Tumoren signifikant erhöht [13].

In der vorliegenden Arbeit zeigte der Microarray, dass eine Calcium-Behandlung in CaSR1-Zellen eine signifikant erhöhte miRNA 23a-Expression induziert und dass Calcium-behandelte CaSR1-Zellen die miRNA 23a signifikant stärker exprimieren als

Calcium-behandelte WT-Zellen. Diese Ergebnisse ließen sich durch die qRT-PCR validieren. Außerdem konnte in der qRT-PCR auch eine doppelt so hohe miRNA 23a-Expression in CaSR4-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen nachgewiesen werden. Weiterhin wurde deutlich, dass pcDNA3- sowie WT-Zellen einen miRNA 23a-Expressionsabfall nach Calcium-Behandlung zeigten und sich in CaSR-überexprimierenden Zellen der gegenteilige Effekt darstellte. Im Kontext der Ergebnisse von Quan *et al* und Petillo *et al*. könnte die miRNA 23a somit eine tumorfördernde Rolle für die Genese des NZK spielen. Außerdem zeigten die vorliegenden Ergebnisse eine miRNA 23a-Expressionserhöhung in CaSR-exprimierenden Zellen insbesondere nach Calcium-Behandlung, sodass auf einen Zusammenhang der miRNA 23a mit dem CaSR und mit einem knochenspezifischen Metastasierungsprozess geschlossen werden kann. In weiteren Experimenten sollte dieser These nachgegangen werden.

5.2 miRNA 23A UNTERSÜTZT DIE KNOCHENMETASTASIERUNG

Durch Hemmung des CaSR wurde eine mögliche Regulierung der miRNA 23a-Expression durch diesen Rezeptor untersucht. Verglichen wurden pcDNA3-, WT-Zellen und die Zellklone CaSR1 und CaSR4. Für pcDNA3-Zellen wurde erwartet, dass die miRNA 23a-Expression unabhängig von einer Behandlung mit Calcium, mit NPS2143 oder mit NPS2143 + Ca²⁺ konstant bleibt bzw. sich verringert. Die qRT-PCR-Ergebnisse erfüllten diese Erwartungen (Abschnitt 4.3). WT-Zellen exprimieren keinen CaSR, weshalb auch für sie keine bzw. nur geringe Effekte durch die Behandlung mit NPS2143 angenommen wurden und die miRNA 23a-Expressionsniveaus geringer als in CaSR-Zellen ausfallen sollten [155]. Die Messergebnisse zeigten eine vergleichsweise geringe miRNA 23a-Expression, die in WT-Zellen ohne und nach Calcium-Behandlung etwa konstant war, nach NPS2143-Behandlung minimal anstieg aber nach NPS2143 + Ca²⁺-Behandlung wieder fiel. Deutlich war jedoch der Vergleich mit CaSR-Zellen, die grundsätzlich bereits eine erhöhte miRNA 23a-Expression zeigten. Eine Calcium-Behandlung führte, wie bereits in den vorigen Tests nachgewiesen, zu einem deutlichen Anstieg der miRNA 23a. Bei Hemmung des CaSR war der miRNA 23a-Expressionsanstieg um mehr als die Hälfte geringer. Somit wurde gezeigt, dass der CaSR

der Auslöser für eine verstärkte miRNA 23a-Expression insbesondere nach Calcium-Aktivierung in 786-O-Zellen ist. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme der folgenden These (Abbildung 32):

NZK-Zellen, die verstärkt zur Ausbildung von Knochenmetastasen neigen, exprimieren in größerem Maß den CaSR. Sie werden durch Calcium-reiches Milieu angezogen, welches zur Aktivierung des CaSR führt. Als Modell für die Untersuchungen dienten NZK-Zellen, die gezielt mit dem CaSR transfiziert wurden. Der CaSR wiederum führt zu einer erhöhten miRNA 23a-Expression, die nach Calcium-Behandlung weiter zunimmt und möglicherweise für eine stärkere Ausprägung metastasierender Eigenschaften, wie z.B der Proliferation verantwortlich ist (Abbildung 32).

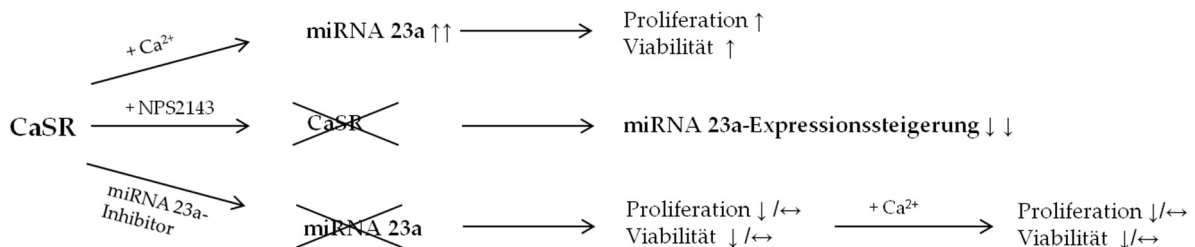


Abbildung 32. Veranschaulichung der angenommenen These über die Zusammenhänge des CaSR mit der miRNA 23a und deren Effekt auf metastasierende Eigenschaften wie z.B. die Proliferation und die Zellviabilität.

In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass NZK-Zellen, die verstärkt den CaSR exprimieren, auf Calcium sensibel durch eine gesteigerte Proliferation reagierten [10, 11]. Auch 786-O-Zellen, die mit dem CaSR transfiziert waren, proliferierten nach Calcium-Behandlung stärker (Tabelle 24) [155]. In Folge der bereits beschriebenen Ergebnisse bezüglich des CaSR und der miRNA 23a sollte untersucht werden, ob die Proliferationssteigerung durch den CaSR selbst oder durch die miRNA 23a verursacht wird. Dazu wurde die miRNA 23a durch einen miRNA 23a-Inhibitor gehemmt. In dem Fall, dass diese miRNA für die Zunahme der Proliferation verantwortlich ist, sollte durch deren Hemmung eine Abnahme der Proliferation der CaSR-Zellen zu erwarten sein, die sich auch durch Ca²⁺ nicht weiter steigern lässt bzw. abnimmt. Letzterer Effekt konnte sowohl in CaSR1-Zellen, als auch in CaSR4-Zellen mittels BrdU-Assay beobachtet werden (Abschnitt 4.5.3 und Tabelle 24). Die Proliferation der pcDNA3- und WT-Zellen nach Calcium-Behandlung blieb dagegen wie

vermutet konstant. Allerdings führte die Calcium-Behandlung auch in Negativkontrolle-transfizierten Zellen der CaSR-Klone zu einer Proliferationsabnahme. Diese fiel jedoch geringer aus als die Abnahme in inhibierten Zellen. Es bestand insgesamt somit ein größerer Proliferationsabfall zwischen miRNA 23a-inhibierten CaSR-Zellen vor und nach Ca^{2+} -Behandlung. Außerdem zeigten die pcDNA3-Zellen einen umgekehrten Effekt. Hier proliferierten miRNA 23a-inhibierte pcDNA3-Zellen stärker als pcDNA3-Negativkontrolle-Zellen. Auch mit Negativkontrolle transfizierte WT-Zellen wiesen eine geringere Proliferation auf als miRNA 23a-inhibierte WT-Zellen und zeigten damit einen gegensätzlichen Effekt zu den CaSR-exprimierenden Zellen. Somit bestätigte auch hier der Einfluss der miRNA 23a-Hemmung auf die Proliferation die angenommene These.

Überraschend waren die Ergebnisse der unbehandelten Zellen, die weder mit miRNA 23a-Inhibitor, noch mit der Negativkontrolle transfiziert waren, im Vergleich mit den miRNA 23a-inhibierten und Negativkontrolle-Zellen. Dabei proliferierten die unbehandelten WT-Zellen stärker als WT-Zellen, in denen die miRNA 23a inhibiert war oder die mit der Negativkontrolle transfiziert waren. miRNA 23a-inhibierte CaSR-Zellklone proliferierten dagegen in deutlich geringerem Ausmaß. Da WT-Zellen keinen CaSR exprimieren und auch die qRT-PCR-Analysen weniger miRNA 23a-Expression zeigten, wird eine unspezifische Erklärung für dieses Phänomen vermutet. Die Ursache könnte in den vorbereitenden Maßnahmen für den Proliferationsassay liegen. Es wurden drei unterschiedliche Zellbehandlungen eingesetzt: Zellen, die weder mit miRNA 23a-Inhibitor noch mit Negativkontrolle transfiziert waren, miRNA 23a-inhibierte Zellen und mit Negativkontrolle transfizierte Zellen, von denen jeweils die Hälfte der Zellen mit Ca^{2+} behandelt wurden. Die beiden Transfektions-Behandlungen wurden in zueinander analoger Vorgehensweise mit Transfektionsreagenz durchgeführt. Sie enthielten, abgesehen vom Inhibitor, dieselben Zusätze. Auch die Behandlungsschritte verliefen nach demselben Protokoll. Unbehandelte Zellen (ohne miRNA 23a-Inhibitor- oder Negativkontrolle-Transfektion) wurden dieser Vorgehensweise nicht unterzogen und enthielten keine Transfektionsreagenzien. Die beschriebenen Proliferationsunterschiede zwischen unbehandelten Zellen und den miRNA 23a-inhibierten oder den Negativkontrollen könnten somit auf einen proliferationshemmenden Effekt durch die

Transfektionsreagenzien zurückzuführen sein. Ein sinnvoller Vergleich kann deshalb nur zwischen miRNA 23a-inhibierten und Negativkontrolle-Zellen gezogen werden.

Auch für die Viabilität der CaSR-Zellklone wurde eine Abnahme nach Hemmung der miRNA 23a erwartet, die sich durch eine Calcium-Behandlung nicht weiter steigern lässt bzw. abnehmen sollte. Die Untersuchungen zeigten für die CaSR-Zellklone eine leichte Viabilitätsminderung im Vergleich zur Negativkontrolle (Abschnitt 4.5.1), die auch nach Calcium-Behandlung weiterhin leicht abnahm (Tabelle 24). Dies bestätigt die Annahme, dass die durch CaSR induzierte erhöhte Zellvitalität über die erhöhte miRNA 23a bewirkt wird.

Die Untersuchung einer möglichen, durch den miRNA 23a-Inhibitor bedingten, Toxizität mittels Messung der Fluoreszenz zeigte für die pcDNA3-, WT-Zellen und die 786-O-Zellklone CaSR1 und CaSR4 konstante Werte. Somit kann eine toxische Wirkung des miRNA 23a-Inhibitors ausgeschlossen werden (Tabelle 24).

Tabelle 24. Übersicht über die Effekte, die durch den CaSR und die miRNA 23a-Inhibition in primären NZK-Zellen und in 786-O-Zellen induziert werden. Dargestellt ist der Einfluss des CaSR und der miRNA 23a auf die Proliferation, Viabilität und Toxizität. Die relativen Abweichungen werden durch die Verwendung von Pfeilen veranschaulicht.

	Primäre Zellen mit hoher CaSR-Expression [10, 11]	786-O		
		CaSR-Zellklone + Ca ²⁺ [155]	CaSR1 und CaSR4 + miRNA 23a-Inhibitor	CaSR1 und CaSR4 + miRNA 23a-Inhibitor + Ca ²⁺
	verglichen mit primären Zellen geringer CaSR-Expression	verglichen mit WT-Zellen	verglichen mit der Negativkontrolle	verglichen mit der Negativkontrolle
Proliferation	↑	↑	↓	↓
Viabilität			↓	↓
Toxizität			↔	↔

5.3 DIE miRNA 374B

Die miRNA 374b, die in CaSR-Zellklonen niedriger exprimiert war als in WT-Zellen, erschien für die Fragestellung besonders interessant, da Gong *et al.* bereits über eine Regulation dieser miRNA durch den CaSR im Prozess der physiologischen Ca²⁺-Homöostase der Niere berichteten [150-152]. Der CaSR reguliert in der Niere die Ca²⁺-

Exkretion durch Permeabilitätsänderungen des Ca^{2+} -Kanals im dicken absteigenden Ast der Henleschleife. Diese Regulation erfolgt durch einen Signalweg über Claudin-14, der miRNA 374b und den CaSR. Gong *et al.* zeigten, dass unter physiologischen Bedingungen nach einer CaSR-Aktivierung durch extrazelluläres Calcium die Expression der miRNA 374b und 9 im Nierengewebe von Mäusen hochreguliert wird [150]. Diese wiederum geben das Signal durch miRNA-gesteuertes Gen-Silencing an Claudin-14 (CLDN14) weiter, welches es schließlich auf Claudin-16-Claudin-19 (CLDN16-CLDN19) überträgt. Hierbei handelt es sich um einen Proteinkomplex, der einen parazellulären Kationenkanal für Ca^{2+} und Mg^{2+} bildet und für die Ca^{2+} -Resorption entscheidend ist. Fehlregulationen innerhalb dieses Signalweges gehen mit Störungen wie Hypercalciurie, Nephrolithiasis oder Nephrocalcinose einher [152]. Die Regulation der miRNA durch CaSR-Signaltransduktion kann auf verschiedenen Ebenen ablaufen: auf der Ebene der Transkription, der Prozessierung oder der Degradation [138]. Die Promotorregion der miRNA 374b enthält eine myc-Bindungsstelle. Hu *et al.* zeigten, dass durch myc die Expression des miRNA 421/374-Clusters in HeLa-Zellen hochreguliert wird [181]. Aufgrund der beschriebenen Literaturergebnisse und der Beteiligung des CaSR an der knochenspezifischen Metastasierung könnte ein Zusammenhang der miRNA 374b mit knochenspezifischen Metastasierungsprozessen vorliegen.

Mittels miRNA-Expressionsanalyse konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die miRNA 374b in dem 786-O-Zellklon CaSR1 signifikant niedriger exprimiert wurde als in WT-Zellen (Abschnitt 4.2.3). Die qRT-PCR-Ergebnisse bestätigten dies für CaSR4- und CaSR9-Zellen. In CaSR1-Zellen war dieser Effekt geringer ausgeprägt. Im Hinblick auf den von Gong *et al.* vorgestellten Signalweg und die Hochregulierung der miRNA 374b unter physiologischen Verhältnissen, könnte eine fehlerhaft herabregulierte miRNA 374b-Expression eine tumor- oder metastasenfördernde Charakteristik darstellen.

5.4 DIE miRNA 181C

Eine weitere miRNA, die sich für das NZK als bedeutend gezeigt hat, ist die miRNA 181c. Diese miRNA wird auf dem Chromosom 19 (37.p5) kodiert und gehört zur miRNA 181-Familie, welche die miRNA 181a, miRNA 181b, miRNA 181c und miRNA 181d zusammenfasst [182]. Im Microarray zeigte sich eine signifikant höhere miRNA 181c-Expression in Ca²⁺-behandelten CaSR1-Zellen im Vergleich zu unaktivierten CaSR1-Zellen. Die Literatur beschreibt gehäuft eine Fehlregulation dieser miRNA und ihre Beteiligung in unterschiedlichen Tumorentitäten sowie Metastasierungsprozessen (wie z.B. Kolonkarzinom, Magenkarzinom, Neuroblastom, NSCLC, Osteosarkom, hepatozelluläres Karzinom (HCC), Mammakarzinom, akute myeloische Leukämie (AML), Gliome, Prostatakarzinom, orales Plattenepithelkarzinom, Zervixkarzinom) [183-192]. Dabei wiesen Tumorzellen in der Regel eine hochregulierte Expression der miRNA 181 auf. Huang *et al.* identifizierten sie dagegen als Target des Bcl-2-Gens im NSCL und zeigten, dass sie hier im Gesunden einen tumorsuppressiven Effekt hat [184]. Sowohl NSCL-Gewebeproben als auch NSCL-Zelllinien wiesen verminderte miRNA 181-Expressionen auf. Ihre gezielte Überexpression hemmte in Zelllinien die Proliferation, Migration, Invasion und förderte die Apoptose. Im kolorektalen Karzinom war die miRNA 181 für ein verstärktes Tumorstadium mitverantwortlich und begünstigte die Entstehung von Lebermetastasen, indem sie als direktes und funktionales Target *Wnt inhibitory factor 1* (WIF1) bindet. In Zellen aus Karzinomen mit Lebermetastasen zeigte sich das Expressionsniveau der miRNA stark erhöht [193]. Erhöhte miRNA 181-Level korrelierten mit einem fortgeschrittenen Stadium sowie dem Vorhandensein von Fernmetastasen und stellten sich als unabhängiger prognostischer Faktor für eine geringere Gesamtüberlebenszeit heraus. Die ektope Expression der miRNA unterdrückte die epithelialen Marker E-Cadherin und Beta-Catenin, während sich die Level des mesenchymalen Markers Vimentin hierdurch erhöhten. Bei WIF1 handelt es sich um ein Protein, das vermutlich in der mesodermalen Entwicklung eine Rolle spielt und 5 EGF-ähnliche Domänen aufweist. WIF1 konnte in einen Zusammenhang mit der endothelial-mesenchymalen Transition (EMT) gebracht werden [193].

In Hinblick auf das NZK sind besonders die Ergebnisse von Youssef *et al.* [194] von Bedeutung. Sie untersuchten Gewebezellen verschiedener NZK-Subtypen sowie gesunde Nierenzellen im Vergleich, um für jeden Subtyp eine spezifische miRNA-Signatur zu identifizieren. Die miRNA-Signatur, die sich für das klarzellige NZK ergab, enthält unter anderem auch die miRNA 181b. Auch Lopez-Lago *et al.* wiesen eine erhöhte Expression der miRNA 181b, bei der es sich um eine weitere Isoform der miRNA 181 handelt, in NZK-Zellen nach [195]. miRNA 181c und miRNA 181b unterscheiden sich in maximal vier Nukleotiden und besitzen dieselbe Kernsequenz an der 5'UTR. Ob die Gleichheit der Kernsequenz dazu führt, dass miRNA einer Familie dieselben Zielgene binden, oder dennoch andere Targets aufweisen, ist nicht abschließend geklärt. Beide Thesen werden in der Literatur durch Beispiele untermauert, so dass nicht von einer Regelmäßigkeit ausgegangen werden kann. Jedoch können Ergebnisse, die zu einer Isoform vorliegen, bei der Untersuchung der miRNA 181c berücksichtigt und getestet werden [182, 196].

Der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Microarray zeigte eine signifikante miRNA 181c-Expressionserhöhung in CaSR1-Zellen nach Calcium-Behandlung (Abschnitt 4.2.4), was jedoch durch die qRT-PCR nicht bestätigt werden konnte. Hierin zeigten sich konstante Expressionsniveaus unabhängig einer Calcium-Behandlung. Die Zellklone CaSR4 und CaSR9 wiesen jedoch eine um etwa 60 % verringerte miRNA 181c-Expression auf als WT-Zellen. Somit könnte die miRNA 181 analog der Ergebnisse von Huang *et al.* für das NSCLC auch in CaSR-exprimierenden NZK-Zellen vermindert sein und eine tumorsuppressive Rolle einnehmen.

5.5 DIE MIRNA 320C

Eine signifikant stärkere Expression in WT-Zellen im Vergleich zu CaSR-Zellen zeigte in der vorliegenden Arbeit die miRNA 320c, die in der Literatur oft als tumorsuppressiv beschrieben und auf dem Chromosom 18 kodiert wird [127, 197-200]. Hsieh *et al.* zeigten, dass die miRNA 320 in Zellen des Prostata-Karzinoms signifikant herabreguliert war und in die Regulation der Wnt/Beta-Catenin-Signalkaskade involviert ist [197]. Durch Bindung der miRNA an das 3'Ende der untranslatierten Beta-Catenin-mRNA wird

Beta-Catenin gehemmt. Die Hemmung der miRNA 320 führte im Gegenschluss zu einer Überexpression von Beta-Catenin und ein Knock-out der miRNA zu verstärkten Tumorzelleigenschaften.

Wan *et al.* stellten dagegen in Kolonkarzinom-Zellen fest, dass die miRNA 320 ein direktes Target des Onkogens FOXM1 darstellt und ebenfalls den Wnt/Beta-Catenin-Weg inaktiviert [198]. FOXM1 und die miRNA korrelierten im Kolongewebe negativ miteinander und die Expression der miRNA 320 war in diesen Tumorzellen herabgesetzt. Durch gezielte Überexpression der miRNA konnte eine Hemmung der Zellproliferation und -invasion beobachtet werden. Gleichzeitig nahm damit die Sensitivität gegenüber Chemoradiotherapie (5-FU und Oxaliplatin) zu. Die miRNA 320 greift somit in unterschiedlichen Tumorentitäten, hier Prostata- und Kolonkarzinom, auf gegensätzliche Weisen in den Wnt/Beta-Catenin-Signalweg ein, was für eine zelltyp- bzw. organspezifische Funktionsweise spricht.

Duan und Wang *et al.* beschrieben außerdem einen G1-Phasen-Arrest, der durch die miRNA 320 ausgelöst wird [199, 201]. Zum einen war dies bei bronchialen Epithelzellen, die karzinogenen Stoffen (Benzopyrenen) ausgesetzt waren, der Fall und zum anderen in Blasentumoren. Dort bindet die miRNA 320 an die Cyclin-abhängige Kinase 6 (CDK6) und induziert einen G1-Phasen-Arrest, wodurch das Zellwachstum gehemmt wird. Bei Unterexpression der miRNA 320 wurde hier eine begünstigte Zellproliferation beobachtet. Insgesamt sammeln sich somit die Hinweise auf einen tumorsuppressiven und antiproliferativen Effekt der miRNA 320 in gesunden Zellen.

In der vorliegenden Arbeit zeigte die miRNA-Expressionsanalyse, dass die miRNA 320c in CaSR1-Zellen nach Ca²⁺-Behandlung signifikant stärker als in CaSR1-Zellen ohne Ca²⁺-Behandlung, jedoch auch in WT-Zellen signifikant stärker als in CaSR1-Zellen exprimiert wird (Abschnitt 4.2.5). Die signifikante Expressionsänderung der CaSR1-Zellklone in Folge der Calcium-Behandlung konnte mittels qRT-PCR nicht bestätigt werden. Die qRT-PCR-Ergebnisse verifizierten jedoch, dass WT-Zellen eine stärkere Expression an miRNA 320c aufweisen als CaSR-Zellen. Wie bereits in der vorgestellten Literatur beschrieben, könnte dieses Ergebnis mit einer tumorsuppressiven oder

metastasierungshemmenden Eigenschaft der miRNA 320c vereinbar sein und deren Herabregulation mit einem verstärkten knochenspezifischen Metastasenwachstum korrelieren.

5.6 DIE MIRNA 424

Signifikante Expressionsunterschiede im Vergleich von CaSR-exprimierenden Zellen und WT-Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls für die miRNA 424 nachgewiesen. Sie wurde bereits im Zusammenhang mit chronisch lymphatischer Leukämie, akuter und chronischer myeloischer Leukämie, Lungen-, Mamma-, Magen-, Pankreas-, Kolon-, Ovarial- und Zervixkarzinom, dem HCC, Osteosarkomen sowie den urologischen Tumoren Nierenzell-, Prostata- und Urothelkarzinom beschrieben [202-215]. Im Zusammenhang mit dem hepatozellulären Karzinom (HCC) beschrieben Yu *et al.* eine negative Regulation der miRNA 424 durch c-Myb, einem myeloblastischen Onkogen, das eine wichtige regulierende Rolle beim Zellwachstum, der Zelldifferenzierung und der Apoptose spielt. Eine Überexpression von c-Myb bedingt eine durch die miRNA 424 induzierte Hemmung der Proliferation und Invasion der HCC-Zellen. HCC-Zellen wiesen eine herabregulierte Expression der miRNA auf. Diese verminderten miRNA-Level stehen im Zusammenhang mit einem verstärkten epithelial-mesenchymalen Übergang sowie einem verminderten programmierten Zelltod bei losgelösten HCC-Zellen.

Besonders relevant für die vorliegende Arbeit waren die Ergebnisse von Chen *et al.* und Gowrishankar *et al.* bezüglich einer Beteiligung der miRNA 424 an der Tumorprogression im NZK. Die simultane Expression der miRNA 424 und miRNA 381 unterdrückt synergistisch die Proliferation und das Überleben von NZK-Zellen, indem die Aktivität der Cyklin-abhängigen Kinase 2 (CDK2) durch Bindung des miRNA-Komplexes an die nukleäre Kinase WEE1 hochreguliert wird [216]. Gowrishankar *et al.* führten eine weitere Differenzierung der miRNA-Expressionsmuster in Abhängigkeit vom Stadium, der Tumorklasse und der Progression des klarzelligem NZK (kNZK) durch [217]. Die miRNA 424 lag unter anderen im kNZK mit hohem Grad, Tumorstadium und der Tumorprogression in erhöhter Expression vor. Auch Petillo *et al.*

beschrieben eine signifikante Überexpression der miRNA 424 im kNZK und korrelierten dieses Ergebnis mit einer schlechteren Prognose [141].

Der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Microarray ergab eine signifikant verringerte miRNA 424-Expression in CaSR-Zellklonen im Vergleich zu WT-Zellen (Abschnitt 5.6). Außerdem zeigten CaSR-Zellklonen nach Calcium-Behandlung eine signifikante Expressionssteigerung der miRNA. Letzterer Expressionsunterschied ließ sich mittels qRT-PCR nicht validieren. Eine CaSR-Aktivierung durch Calcium, z.B. durch Calcium-reiches Milieu, wie es in Knochen vorliegt, scheint somit keinen spezifischen Effekt auf die miRNA 424-Expression zu haben. Die qRT-PCR-Analyse bestätigte auch die Expressionsunterschiede zwischen WT-Zellen und dem CaSR1-Klon nicht, jedoch zeigte sich ein deutlicher Expressionsabfall in CaSR4- und CaSR9-Zellklonen. In Zusammenschau der Ergebnisse von Chen *et al.* könnte die Herabregulation der miRNA 424 somit mit verstärkten proliferativen und tumorfördernden Eigenschaften und insbesondere einer verstärkten knochenspezifischen Metastasierung einhergehen [216].

5.7 METHODENKRITIK

Die Validierung der Microarrayergebnisse erfolgte mittels qRT-PCR. Für die Polymerase-Kettenreaktion mit miRNA sind verschiedene Kit-Systeme auf dem Markt erhältlich, die sich unterschiedliche Messprinzipien zur Grundlage machen. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst das *TaqMan* MicroRNA *Reverse Transcription* Kit zusammen mit dem *TaqMan* MicroRNA-Assay verwendet. Dabei wurden die miRNA nach Kultivierung der Zellen in Zellschalen und nach Calcium-Behandlung mit dem *miRNeasy*-Mini-Kit extrahiert, per Nanodrop quantifiziert und mit Hilfe spezifischer Primer wurde die cDNA synthetisiert. Die anschließende Quantifizierung mit Hilfe der qRT-PCR führte zu sehr hohen Cps und großen Fehlerwerten. Es wurde eine schlechte Reproduzierbarkeit beobachtet. Auch durch Variation der eingesetzten Konzentrationen oder durch Variation der Mess- und Reaktionsbedingungen (Temperatur, Laufzeit) ließen sich keine genauen Ergebnisse erzielen.

Um durch eine Vervielfachung der Ausgangs-miRNA-Konzentration möglicherweise frühere Signale zu erhalten, wurde ein Präamplifikationskit (*TaqMan* PreAmp Master Mix) zwischengeschaltet. Damit potenzierten sich jedoch die Fehlergrößen.

Mestdagh *et al.* stellten in einer Vergleichsstudie 12 kommerziell erhältliche miRNA-Analyse-Kits gegenüber und untersuchten hinsichtlich der Parameter Reproduzierbarkeit, Sensitivität, Genauigkeit, Spezifität und Konkordanz zu Expressionunterschieden [218]. Hierbei zeigte die Quanta-Methode in allen Bereichen bessere Ergebnisse. Für den Fall, dass sehr geringe Probenmengen im Nanogramm-Bereich vorliegen, schnitt die *TaqMan*-Methode besser ab. Darin könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Messergebnisse der beiden Systeme liegen.

Ein weiterer Vorteil der Quanta-Methode und eine mögliche Ursache für die geringe Präzision der Messungen mit dem *TaqMan*-System könnte in der von Ryan *et al.* beschriebenen Veränderung der miRNA in Krebszellen liegen [219]. Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms* = SNP) können in miRNA-Genen auftreten und deren Transkriptionsvorgänge modulieren oder Target-Bindestellen und miRNA-mRNA-Interaktionen erleichtern. Sie stehen somit im Zusammenhang mit einem erhöhten Entartungsrisiko der Zellen und wurden gehäuft in miRNA maligner Zellen analysiert. Die häufigsten Modifikationen wurden an der 3'UTR-Region der miRNA beobachtet, wobei ebenso Modifikationen der 5'UTR auftreten [219]. Modifikationen der *seed*-Region der miRNA, die die spezifische Bindung der mRNA vorgibt und die Funktionsweise der miRNA definiert, sind dagegen rar und nicht von Bedeutung. Konkret verzeichneten Ryan *et al.* unter anderem auch Modifikationen der miRNA 181 durch SNP. Die *TaqMan*-Methode beruht jedoch auf dem Einsatz spezifischer *stem-loop*-Primer, die im ersten Schritt an die miRNA binden. Anschließend wird durch komplementäres Binden von dNTPs ausgehend vom Primer die miRNA in cDNA umgeschrieben. Diese wird durch den Einsatz spezifischer *forward*- und *reverse*-Primer in der PCR amplifiziert. Aufgrund der beschriebenen SNP könnte möglicherweise das Bindevermögen des *stem-loop*-Primers beeinträchtigt sein, so dass im Amplifikationsschritt zu geringe Produktmengen entstehen. Dies würde die hohen Cps

der *TaqMan*-qRT-PCR-Messungen und die geringe Präzision erklären. Die Quanta-Methode beinhaltet dagegen zunächst eine Polyadenylierung der miRNA. Hierdurch werden die miRNA mit einem Poly-A-Schwanz versehen, an den ein universeller Oligo-dT-Adapter Primer anknüpft, der den Ausgangspunkt für die cDNA-Synthese darstellt. Die PCR-Amplifikation wird schließlich mittels eines - zum Oligo-dT-Adapter-Primer komplementären - Universal Primer und einem spezifischen Primer initiiert. Somit müsste das Messprinzip weitgehend unbeeinträchtigt von möglicherweise vorliegenden SNP sein. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit die Quanta-Methode verwendet.

5.8 AUSBLICK

In dieser Arbeit wurden miRNA untersucht, die im Zusammenhang mit dem CaSR und der knochenspezifischen Metastasierung des Nierenzellkarzinoms stehen. Die Rolle von miRNA an diesem Metastasierungsprozess ist noch nahezu unerforscht. Auch die genaue Funktionsweise des CaSR und die Ursache für die CaSR-Expressionserhöhung in NZK-Zellen mit Neigung zur knochenspezifischen Metastasierung ist in vieler Hinsicht ungeklärt und wirft noch einige Fragen auf.

Nach den in dieser Arbeit untersuchten Effekten der miRNA 23a auf die Proliferation, wäre weiterhin die Untersuchung des miRNA 23a-Einflusses auf weitere metastasierungsfördernde Eigenschaften wie z.B die Migration, die Adhäsion und die Invasivität interessant. In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits eine verstärkte Migration und Adhäsion für CaSR-exprimierende Zellen und eine weitere Zunahme nach Calcium-Behandlung gezeigt. Sollte die miRNA 23a eine Rolle für diese Effekte spielen, wäre durch ihre Inhibition ein Rückgang der Migrations- und Adhäsionseigenschaften zu erwarten.

Die bisherigen Untersuchungen wurden an Zellen der Zelllinie 786-O und an CaSR-transfizierten 786-O-Zellen durchgeführt. Eine Erweiterung um andere NZK-Zelllinien wäre sinnvoll. Im nächsten Schritt könnten diese Untersuchungen anhand von Primärtumorzellen des kNZK oder alternativ bzw. ergänzend an kNZK-Gewebe

durchgeführt werden. Dabei wäre jeweils ein Vergleich von Primärtumor-Zellen bzw. -Gewebe des NZK ohne Knochenmetastasen, mit Primärknochenmetastasen und mit solchen die im Verlauf Knochenmetastasen entwickeln interessant.

Neben den Ergebnissen bezüglich der miRNA 23a, zeigten sich in der miRNA-Expressionsanalyse von 786-O-Zellen vom WT und CaSR1-Zellen diverse signifikante miRNA-Expressionsänderungen. Im Hinblick auf die Frage nach weiteren prognostischen Markern könnten außer den bereits in Kapitel 4 und 5 beschriebenen auch die 8 miRNA untersucht werden, die sowohl im Vergleich von WT-Zellen ohne und nach Calcium-Behandlung als auch im Vergleich von CaSR-Zellen ohne und nach Calcium-Behandlung signifikant verändert waren. Diese Untersuchungen würden einen tieferen Einblick in die Regelwerke des NZK erlauben.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Kommt es beim Nierenzellkarzinom zur Ausbildung von Fernmetastasen, sinkt die Prognose und Überlebensrate rapide ab. Auch heute bieten die Therapieoptionen in diesem Stadium lediglich eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens um wenige Monate. Ein bevorzugtes Organ für die Metastasierung des NZK sind die Knochen, in die der Tumor in 30 % der Fälle streut. Diskutiert werden als Ursache hierfür das günstige Mikromilieu der Knochenmatrix sowie die hohe extrazelluläre Calcium-Konzentration in Verbindung mit dem Calcium-sensitiven Rezeptor (CaSR). Die intensive Erforschung der genauen zellulären Mechanismen der knochenspezifischen Metastasierung stellt im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapien weiterhin eine große Herausforderung dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des CaSR auf die Expression von miRNA im Hinblick auf eine knochenspezifische Metastasierung des Nierenzellkarzinoms untersucht. Dazu wurden als Modell 786-O Zellen, die mit dem CaSR transfiziert waren, eingesetzt und diese mit WT-Zellen verglichen. Mittels einer miRNA-Expressionsanalyse konnten zahlreiche signifikant veränderte miRNA im Vergleich von CaSR-Zellklonen und WT-Zellen jeweils ohne und nach Calcium-Behandlung identifiziert werden. Davon waren aufgrund von Literaturdaten die miRNA 23a, die miRNA 374b, die miRNA 181c, die miRNA 320c und die miRNA 424 im Hinblick auf die Fragestellung besonders interessant. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse konnten zu den ausgewählten miRNA mittels qRT-PCR überwiegend validiert werden. Die miRNA 374b und 320c zeigten in CaSR-Zellklonen einen Expressionsabfall im Vergleich zu WT-Zellen. Auch bei den Expressionslevel der miRNA 181c und 424 zeigte sich dieser Effekt in zwei der verwendeten CaSR-Zellklonen. Die miRNA 23a wies in CaSR-Zellklonen eine deutliche Expressionssteigerung nach Calcium-Behandlung auf und wurde in Calcium-behandelten CaSR-Zellklonen deutlich stärker als in Calcium-behandelten WT-Zellen exprimiert. Nach einer Hemmung des CaSR mit NPS2143 zeigte sich, dass der miRNA 23a-Expressionsanstieg nach Calcium-Behandlung um mehr als die Hälfte zurückging.

Dies legte die Annahme nahe, dass die Expression der miRNA 23a durch den CaSR reguliert wird und dessen Aktivierung durch Calcium einen miRNA 23a-Expressionsanstieg bewirkt.

Frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten bereits, dass mit einer CaSR-Expressionssteigerung verstärkte metastatische Eigenschaften wie die Zellproliferation, die Migration und Adhäsion einhergehen. Die Proliferation der Zellen war dabei nach Calcium-Behandlung im Vergleich zu WT-Zellen deutlich gesteigert. Nach den hier beschriebenen Ergebnissen bezüglich der miRNA 23a stellte sich nun die Frage, ob solche Eigenschaften durch die vom CaSR regulierte miRNA 23a ausgelöst werden. Deshalb wurde die miRNA 23a inhibiert und die Auswirkung dieser Hemmung auf die Prozesse Proliferation und Zellviabilität untersucht. Im Fall, dass die CaSR-bedingte erhöhte Proliferation durch miRNA 23a vermittelt wird, sollte unter miRNA 23a-Hemmung ein Proliferationsanstieg nach Calcium-Behandlung ausbleiben. Tatsächlich zeigte sich, dass die Proliferation der CaSR-Zellklone nach Calcium-Behandlung bei Hemmung der miRNA leicht verringert war. Auch die Viabilität der Zellen nahm bei miRNA 23a-Hemmung im Vergleich zur Negativkontrolle leicht ab.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die miRNA 23a durch den CaSR reguliert wird und eine Rolle in zellulären Signalwegen spielt, die zu verstärkten metastatischen Eigenschaften führt, wie z.B. der Zellproliferation oder der Viabilität. Aus diesem Grund leisten die Erkenntnisse über den CaSR und die miRNA 23a einen Beitrag zur Aufklärung der intrazellulären Signalwege in knochenmetastasierenden NZK-Zellen und könnten damit für die Entwicklung weiterer zielgerichteter Therapeutika und als prognostische Marker von großer Bedeutung sein.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843.
2. Ventura, A. and T. Jacks, *MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way*. Cell, 2009. **136**(4): p. 586.
3. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 834.
4. Chow, W.H., L.M. Dong, and S.S. Devesa, *Epidemiology and risk factors for kidney cancer*. Nat Rev Urol, 2010. **7**(5): p. 245.
5. Khan, N. and H. Mukhtar, *Cancer and metastasis: prevention and treatment by green tea*. Cancer Metastasis Rev, 2010. **29**(3): p. 435.
6. Motzer, R.J., et al., *Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma*. N Engl J Med, 2007. **356**(2): p. 115.
7. Escudier, B., et al., *Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial*. Lancet, 2007. **370**(9605): p. 2103.
8. Motzer, R.J., et al., *Pazopanib versus sunitinib in metastatic renal-cell carcinoma*. N Engl J Med, 2013. **369**(8): p. 722.
9. Mikami, S., et al., *Invasion and metastasis of renal cell carcinoma*. Med Mol Morphol, 2014. **47**(2): p. 63.
10. Joeckel, E., et al., *High calcium concentration in bones promotes bone metastasis in renal cell carcinomas expressing calcium-sensing receptor*. Mol Cancer, 2014. **13**: p. 42.
11. Brenner, W., et al., *[Bone metastasis by renal cell carcinoma. Importance of calcium and calcium-sensing receptor]*. Urologe A, 2015. **54**(6): p. 839.
12. Breuksch, I., M. Weinert, and W. Brenner, *The role of extracellular calcium in bone metastasis*. J Bone Oncol, 2016. **5**(3): p. 143.
13. Heinzelmann, J., et al., *Specific miRNA signatures are associated with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma*. World J Urol, 2011. **29**(3): p. 367.
14. Fornara, P. and M.R. Hoda, *[Renal cell carcinoma]*. Urologe A, 2011. **50 Suppl 1**: p. 219.
15. Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Berlin., *Krebs in Deutschland 2007/2008*. [E-Artikel]. 2012. Zitiert am 24.07.17. 8. Edition. Verfügbar auf: <http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2012.html>.
16. Znaor, A., et al., *International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality*. Eur Urol, 2015. **67**(3): p. 519.
17. Cohen, H.T. and F.J. McGovern, *Renal-cell carcinoma*. N Engl J Med, 2005. **353**(23): p. 2477.
18. Pischon, T., et al., *Body size and risk of renal cell carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)*. Int J Cancer, 2006. **118**(3): p. 728.
19. Chow, W.H., et al., *Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men*. N Engl J Med, 2000. **343**(18): p. 1305.
20. Hunt, J.D., et al., *Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies*. Int J Cancer, 2005. **114**(1): p. 101.

21. Brennan, P., et al., *Tobacco smoking, body mass index, hypertension, and kidney cancer risk in central and eastern Europe*. Br J Cancer, 2008. **99**(11): p. 1912.
22. Nouh, M.A., et al., *Renal cell carcinoma in patients with end-stage renal disease: relationship between histological type and duration of dialysis*. BJU Int, 2010. **105**(5): p. 620.
23. Mandel, J.S., et al., *International renal-cell cancer study. IV. Occupation*. Int J Cancer, 1995. **61**(5): p. 601.
24. Schlehofer, B., et al., *Occupation, smoking and demographic factors, and renal cell carcinoma in Germany*. Int J Epidemiol, 1995. **24**(1): p. 51.
25. Vamvakas, S., et al., *Renal cell cancer correlated with occupational exposure to trichloroethene*. J Cancer Res Clin Oncol, 1998. **124**(7): p. 374.
26. Ljungberg, B., et al., *Renal cell carcinoma guideline*. Eur Urol, 2007. **51**(6): p. 1502.
27. Liu, X., et al., *miR-23a targets interferon regulatory factor 1 and modulates cellular proliferation and paclitaxel-induced apoptosis in gastric adenocarcinoma cells*. PLoS One, 2013. **8**(6): e64707.
28. Clark, P.E., *The role of VHL in clear-cell renal cell carcinoma and its relation to targeted therapy*. Kidney Int, 2009. **76**(9): p. 939.
29. Clifford, S.C., et al., *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, 1998. **22**(3): p. 200.
30. Buentig, N., S. Storkel, and J. Atzpodien, *[Molecular genetic changes in renal cell carcinomas]*. Urologe A, 2002. **41**(5): p. 475.
31. UICC, TNM-Klassifikation.[Internetquelle]. 2010. Zitiert am 23.07.17. Verfügbar auf: <http://uicc.org/tnm>.
32. Cairns, P., *Renal cell carcinoma*. Cancer Biomark, 2010. **9**(1-6): p. 461.
33. Pavlovich, C.P. and L.S. Schmidt, *Searching for the hereditary causes of renal-cell carcinoma*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(5): p. 381.
34. Manski, D., *Das Urologielehrbuch*. Ausgabe 2015. Detmold: Manski, Dr. Dirk. 800 p.
35. Delahunt, B., et al., *The International Society of Urological Pathology (ISUP) grading system for renal cell carcinoma and other prognostic parameters*. Am J Surg Pathol, 2013. **37**(10): p. 1490.
36. Sheth, S., et al., *Current concepts in the diagnosis and management of renal cell carcinoma: role of multidetector ct and three-dimensional CT*. Radiographics, 2001. **21 Spec No**: p. S237.
37. Ljungberg, B., et al., *EAU guidelines on renal cell carcinoma*. 2016. [E-Artikel]. Zitiert am 24.07.17. Verfügbar auf: <https://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-Renal-Cell-Carcinoma-2016.pdf>.
38. Merseburger, A.S., et al., *EAU guidelines on robotic and single-site surgery in urology*. Eur Urol, 2013. **64**(2): p. 277.
39. Escudier, B., et al., *Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2014. **25 Suppl 3**: p. iii49.
40. Bedke, J., et al., *Targeted therapy in renal cell carcinoma: moving from molecular agents to specific immunotherapy*. World J Urol, 2014. **32**(1): p. 31.
41. Negrier, S., et al., *Medroxyprogesterone, interferon alfa-2a, interleukin 2, or combination of both cytokines in patients with metastatic renal carcinoma of intermediate prognosis: results of a randomized controlled trial*. Cancer, 2007. **110**(11): p. 2468.

42. Hsieh, J.J., et al., *Renal cell carcinoma*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17009.
43. Motzer, R.J. and R.M. Bukowski, *Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma*. J Clin Oncol, 2006. **24**(35): p. 5601.
44. Posadas, E.M., S. Limvorasak, and R.A. Figlin, *Targeted therapies for renal cell carcinoma*. Nat Rev Nephrol, 2017. **13**(8): p. 496.
45. Staehler, M., et al., [*Systemic therapy of renal cell carcinoma*]. Urologe A, 2010. **49**(12): p. 1543; quiz 1551.
46. Miller, K., et al., [*Interdisciplinary Recommendations for the Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma*]. Aktuelle Urol, 2017. **48**(1): p. 72.
47. Di Lorenzo, G., Re: *Borje Ljungberg, Damian C. Hanbury, Marcus A. Kuczyk, Axel S. Merseburger, Peter F.A. Mulders, Jean-Jaques Patard and Ioanel C. Sinescu. Renal cell carcinoma guideline*. Eur Urol 2007;51:1502-10. Eur Urol, 2007. **52**(3): p. 926; author reply 928.
48. Eisfeld, A.K., et al., *miR-3151 interplays with its host gene BAALC and independently affects outcome of patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia*. Blood, 2012. **120**(2): p. 249.
49. Motzer, R.J., et al., *Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma*. N Engl J Med, 2015. **373**(19): p. 1803.
50. Joseph, R.W., G. Chatta, and U. Vaishampayan, *Nivolumab treatment for advanced renal cell carcinoma: Considerations for clinical practice*. Urol Oncol, 2017. **35**(4): p. 142.
51. Rini, B.I. and M.B. Atkins, *Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma*. Lancet Oncol, 2009. **10**(10): p. 992.
52. Motzer, R.J., et al., *Treatment outcome and survival associated with metastatic renal cell carcinoma of non-clear-cell histology*. J Clin Oncol, 2002. **20**(9): p. 2376.
53. Heng, D.Y., et al., *Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study*. J Clin Oncol, 2009. **27**(34): p. 5794.
54. Fridman, E., et al., *Accurate molecular classification of renal tumors using microRNA expression*. J Mol Diagn, 2010. **12**(5): p. 687.
55. Patard, J.J., et al., *Optimizing treatment for metastatic renal cell carcinoma*. Expert Rev Anticancer Ther, 2011. **11**(12): p. 1901.
56. Janzen, N.K., et al., *Surveillance after radical or partial nephrectomy for localized renal cell carcinoma and management of recurrent disease*. Urol Clin North Am, 2003. **30**(4): p. 843.
57. Tumorregister München. [Internetquelle]. Zitiert am 25.07.17. Verfügbar auf: http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/surv/surv_C64_G.pdf.
58. Chiang, A.C. and J. Massague, *Molecular basis of metastasis*. N Engl J Med, 2008. **359**(26): p. 2814.
59. Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 563.
60. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 453.
61. Turajlic, S. and C. Swanton, *Metastasis as an evolutionary process*. Science, 2016. **352**(6282): p. 169.
62. Brooks, S.A., et al., *Molecular interactions in cancer cell metastasis*. Acta Histochem, 2010. **112**(1): p. 3.

63. Cavallaro, U. and G. Christofori, *Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(2): p. 118.
64. Birchmeier, W. and J. Behrens, *Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1198**(1): p. 11.
65. Hazan, R.B., et al., *Cadherin switch in tumor progression*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1014**: p. 155.
66. Niessen, C.M., D. Leckband, and A.S. Yap, *Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation*. Physiol Rev, 2011. **91**(2): p. 691.
67. Sahai, E., *Illuminating the metastatic process*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(10): p. 737.
68. Wyckoff, J.B., et al., *A critical step in metastasis: in vivo analysis of intravasation at the primary tumor*. Cancer Res, 2000. **60**(9): p. 2504.
69. Bashyam, M.D., *Understanding cancer metastasis: an urgent need for using differential gene expression analysis*. Cancer, 2002. **94**(6): p. 1821.
70. Morgan-Parkes, J.H., *Metastases: mechanisms, pathways, and cascades*. AJR Am J Roentgenol, 1995. **164**(5): p. 1075.
71. Oppenheimer, S.B., *Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and new advances*. Acta Histochem, 2006. **108**(5): p. 327.
72. Blood, C.H. and B.R. Zetter, *Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis*. Biochim Biophys Acta, 1990. **1032**(1): p. 89.
73. Nieswandt, B., et al., *Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets*. Cancer Res, 1999. **59**(6): p. 1295.
74. Im, J.H., et al., *Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation*. Cancer Res, 2004. **64**(23): p. 8613.
75. Wong, S.Y. and R.O. Hynes, *Lymphatic or hematogenous dissemination: how does a metastatic tumor cell decide?* Cell Cycle, 2006. **5**(8): p. 812.
76. Quigley, J.P. and P.B. Armstrong, *Tumor cell intravasation elucidated: the chick embryo opens the window*. Cell, 1998. **94**(3): p. 281.
77. Alizadeh, A.M., S. Shiri, and S. Farsinejad, *Metastasis review: from bench to bedside*. Tumour Biol, 2014. **35**(9): p. 8483.
78. Jeon, J.S., et al., *In vitro model of tumor cell extravasation*. PLoS One, 2013. **8**(2): e56910.
79. Schluter, K., et al., *Organ-specific metastatic tumor cell adhesion and extravasation of colon carcinoma cells with different metastatic potential*. Am J Pathol, 2006. **169**(3): p. 1064.
80. Weis, S.M. and D.A. Cheresh, *Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability*. Nature, 2005. **437**(7058): p. 497.
81. Uhr, J.W., et al., *Molecular profiling of individual tumor cells by hyperspectral microscopic imaging*. Transl Res, 2012. **159**(5): p. 366.
82. Naumov, G.N., et al., *Persistence of solitary mammary carcinoma cells in a secondary site: a possible contributor to dormancy*. Cancer Res, 2002. **62**(7): p. 2162.
83. Gelao, L., et al., *Tumour dormancy and clinical implications in breast cancer*. Ecancermedicalscience, 2013. **7**: p. 320.

84. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996. **86**(3): p. 353.
85. Steeg, P.S., *Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(1): p. 55.
86. Langley, R.R. and I.J. Fidler, *The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs*. Int J Cancer, 2011. **128**(11): p. 2527.
87. Poste, G. and L. Paruch, *Stephen Paget, M.D., F.R.C.S., (1855-1926). A retrospective*. Cancer Metastasis Rev, 1989. **8**(2): p. 93.
88. Paget, S., *The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889*. Cancer Metastasis Rev, 1989. **8**(2): p. 98.
89. Irmisch, A. and J. Huelsken, *Metastasis: New insights into organ-specific extravasation and metastatic niches*. Exp Cell Res, 2013. **319**(11): p. 1604.
90. Pienta, K.J., et al., *The cancer diaspora: Metastasis beyond the seed and soil hypothesis*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(21): p. 5849.
91. Roodman, G.D., *Mechanisms of bone metastasis*. Discov Med, 2004. **4**(22): p. 144.
92. Mundy, G.R., *Mechanisms of bone metastasis*. Cancer, 1997. **80**(8 Suppl): p. 1546.
93. Nguyen, D.X., P.D. Bos, and J. Massague, *Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 274.
94. Greenlee, R.T., et al., *Cancer statistics, 2001*. CA Cancer J Clin, 2001. **51**(1): p. 15.
95. van Driel, M. and J.P. van Leeuwen, *Cancer and bone: a complex complex*. Arch Biochem Biophys, 2014. **561**: p. 159.
96. Wood, S.L. and J.E. Brown, *Skeletal metastasis in renal cell carcinoma: current and future management options*. Cancer Treat Rev, 2012. **38**(4): p. 284.
97. Saidak, Z., et al., *Extracellular calcium promotes the migration of breast cancer cells through the activation of the calcium sensing receptor*. Exp Cell Res, 2009. **315**(12): p. 2072.
98. Hu, J. and A.M. Spiegel, *Structure and function of the human calcium-sensing receptor: insights from natural and engineered mutations and allosteric modulators*. J Cell Mol Med, 2007. **11**(5): p. 908.
99. Brown, E.M. and R.J. MacLeod, *Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling*. Physiol Rev, 2001. **81**(1): p. 239.
100. Saidak, Z., R. Mentaverri, and E.M. Brown, *The role of the calcium-sensing receptor in the development and progression of cancer*. Endocr Rev, 2009. **30**(2): p. 178.
101. Houillier, P., et al., *What keeps serum calcium levels stable?* Joint Bone Spine, 2003. **70**(6): p. 407.
102. Brown, E.M., et al., *Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid*. Nature, 1993. **366**(6455): p. 575.
103. Brown, E.M., *The extracellular Ca²⁺-sensing receptor: central mediator of systemic calcium homeostasis*. Annu Rev Nutr, 2000. **20**: p. 507.
104. Peacock, M., *Calcium metabolism in health and disease*. Clin J Am Soc Nephrol, 2010. **5** Suppl 1: p. S23.
105. Quarles, L.D., *Extracellular calcium-sensing receptors in the parathyroid gland, kidney, and other tissues*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2003. **12**(4): p. 349.

106. Riccardi, D., et al., *Localization of the extracellular Ca²⁺/polyvalent cation-sensing protein in rat kidney*. Am J Physiol, 1998. **274**(3 Pt 2): p. F611.
107. Riccardi, D. and E.M. Brown, *Physiology and pathophysiology of the calcium-sensing receptor in the kidney*. Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **298**(3): p. F485.
108. Sugimoto, T., et al., *Effects of high calcium concentration on the functions and interactions of osteoblastic cells and monocytes and on the formation of osteoclast-like cells*. J Bone Miner Res, 1993. **8**(12): p. 1445.
109. Marie, P.J., *The calcium-sensing receptor in bone cells: a potential therapeutic target in osteoporosis*. Bone, 2010. **46**(3): p. 571.
110. Silver, I.A., R.J. Murrills, and D.J. Etherington, *Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts*. Exp Cell Res, 1988. **175**(2): p. 266.
111. Liao, J., et al., *Extracellular calcium as a candidate mediator of prostate cancer skeletal metastasis*. Cancer Res, 2006. **66**(18): p. 9065.
112. Chirgwin, J.M. and T.A. Guise, *Molecular mechanisms of tumor-bone interactions in osteolytic metastases*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2000. **10**(2): p. 159.
113. Guise, T.A., et al., *Molecular mechanisms of breast cancer metastases to bone*. Clin Breast Cancer, 2005. **5 Suppl**(2): p. S46.
114. Sanders, J.L., et al., *Extracellular calcium-sensing receptor expression and its potential role in regulating parathyroid hormone-related peptide secretion in human breast cancer cell lines*. Endocrinology, 2000. **141**(12): p. 4357.
115. Tfelt-Hansen, J., et al., *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, 2003. **285**(2): p. E329.
116. Yasuda, H., et al., *A novel molecular mechanism modulating osteoclast differentiation and function*. Bone, 1999. **25**(1): p. 109.
117. Yoneda, T. and T. Hiraga, *Crosstalk between cancer cells and bone microenvironment in bone metastasis*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **328**(3): p. 679.
118. Ignatiadis, M. and C. Sotiriou, *Luminal breast cancer: from biology to treatment*. Nat Rev Clin Oncol, 2013. **10**(9): p. 494.
119. Nemeth, E.F., et al., *Calcimimetics with potent and selective activity on the parathyroid calcium receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 4040.
120. Jensen, A.A. and H. Brauner-Osborne, *Allosteric modulation of the calcium-sensing receptor*. Curr Neuropharmacol, 2007. **5**(3): p. 180.
121. Nemeth, E.F., et al., *Calcilytic compounds: potent and selective Ca²⁺ receptor antagonists that stimulate secretion of parathyroid hormone*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **299**(1): p. 323.
122. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215.
123. Lai, E.C., *Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation*. Nat Genet, 2002. **30**(4): p. 363.
124. Lewis, B.P., et al., *Prediction of mammalian microRNA targets*. Cell, 2003. **115**(7): p. 787.
125. Lee, R.C. and V. Ambros, *An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans*. Science, 2001. **294**(5543): p. 862.

126. Chow, T.F., et al., *Differential expression profiling of microRNAs and their potential involvement in renal cell carcinoma pathogenesis*. Clin Biochem, 2010. **43**(1-2): p. 150.
127. mirBase, *miRBase: the microRNA database*. [Internetquelle]. Zitiert am 25.07.17. Verfügbar auf: <http://www.mirbase.org/>.
128. Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel, *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. Cell, 2005. **120**(1): p. 15.
129. Xie, X., et al., *Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals*. Nature, 2005. **434**(7031): p. 338.
130. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281.
131. Gottardo, F., et al., *Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers*. Urol Oncol, 2007. **25**(5): p. 387.
132. Heinzelmann, J., et al., *MicroRNAs with prognostic potential for metastasis in clear cell renal cell carcinoma: a comparison of primary tumors and distant metastases*. Ann Surg Oncol, 2014. **21**(3): p. 1046.
133. Kowalik, C.G., et al., *Profiling microRNA from nephrectomy and biopsy specimens: predictors of progression and survival in clear cell renal cell carcinoma*. BJU Int, 2017.
134. Croce, C.M., *Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(10): p. 704.
135. Kim, V.N., J. Han, and M.C. Siomi, *Biogenesis of small RNAs in animals*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(2): p. 126.
136. Carthew, R.W. and E.J. Sontheimer, *Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs*. Cell, 2009. **136**(4): p. 642.
137. Diederichs, S. and D.A. Haber, *Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1097.
138. Krol, J., I. Loedige, and W. Filipowicz, *The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(9): p. 597.
139. Nana-Sinkam, S.P. and C.M. Croce, *MicroRNAs as therapeutic targets in cancer*. Transl Res, 2011. **157**(4): p. 216.
140. Schratt, G., *microRNAs at the synapse*. Nat Rev Neurosci, 2009. **10**(12): p. 842.
141. Petillo, D., et al., *MicroRNA profiling of human kidney cancer subtypes*. Int J Oncol, 2009. **35**(1): p. 109.
142. Slaby, O., et al., *Identification of MicroRNAs associated with early relapse after nephrectomy in renal cell carcinoma patients*. Genes Chromosomes Cancer, 2012. **51**(7): p. 707.
143. Khella, H.W., et al., *Low expression of miR-126 is a prognostic marker for metastatic clear cell renal cell carcinoma*. Am J Pathol, 2015. **185**(3): p. 693.
144. Wu, X., et al., *Identification of a 4-microRNA signature for clear cell renal cell carcinoma metastasis and prognosis*. PLoS One, 2012. **7**(5): e35661.
145. Fritz, H.K., et al., *The miR(21/10b) ratio as a prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma*. Eur J Cancer, 2014. **50**(10): p. 1758.
146. Zaman, M.S., et al., *Up-regulation of microRNA-21 correlates with lower kidney cancer survival*. PLoS One, 2012. **7**(2): e31060.

147. Faragalla, H., et al., *The clinical utility of miR-21 as a diagnostic and prognostic marker for renal cell carcinoma*. J Mol Diagn, 2012. **14**(4): p. 385.
148. Teixeira, A.L., et al., *Higher circulating expression levels of miR-221 associated with poor overall survival in renal cell carcinoma patients*. Tumour Biol, 2014. **35**(5): p. 4057.
149. Chanudet, E., et al., *Large-scale genome-wide screening of circulating microRNAs in clear cell renal cell carcinoma reveals specific signatures in late-stage disease*. Int J Cancer, 2017.
150. Gong, Y., et al., *Claudin-14 regulates renal Ca(+)(+) transport in response to CaSR signalling via a novel microRNA pathway*. EMBO J, 2012. **31**(8): p. 1999.
151. Gong, Y. and J. Hou, *Claudin-14 underlies Ca(+)(+)-sensing receptor-mediated Ca(+)(+) metabolism via NFAT-microRNA-based mechanisms*. J Am Soc Nephrol, 2014. **25**(4): p. 745.
152. Gong, Y., et al., *Epigenetic regulation of microRNAs controlling CLDN14 expression as a mechanism for renal calcium handling*. J Am Soc Nephrol, 2015. **26**(3): p. 663.
153. Gnarra, J.R., et al., *Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma*. Nat Genet, 1994. **7**(1): p. 85.
154. Brodaczewska, K.K., et al., *Choosing the right cell line for renal cell cancer research*. Mol Cancer, 2016. **15**(1): p. 83.
155. Haber, T., *Einfluss des Calcium-sensitiven Rezeptors auf knochenspezifische Metastasierungsprozesse des Nierenzellkarzinoms*. [Dissertation]. 2015.
156. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263.
157. Thermo Fisher, *PCR Cycling Parameters—Six Key Considerations for Success*. [Internetquelle]. Zitiert am 22.07.17. Verfügbar auf: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-cycling-considerations.html>.
158. Powledge, T.M., *The polymerase chain reaction*. Adv Physiol Educ, 2004. **28**(1-4): p. 44.
159. Higuchi, R., et al., *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. Biotechnology (N Y), 1993. **11**(9): p. 1026.
160. Higuchi, R., et al., *Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences*. Biotechnology (N Y), 1992. **10**(4): p. 413.
161. Valasek, M.A. and J.J. Repa, *The power of real-time PCR*. Advances in Physiology Education, 2005. **29**(3): p. 151.
162. ThermoFisher, *MicroRNA Analysis Using TaqMan Assays*. [Internetquelle]. Zitiert am 24.07.17. Verfügbar auf: <http://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/mirna-ncrna-taqman-assays.html>.
163. Biosyn, *TaqMan vs. SYBR Green Chemistries*. [Internetquelle]. Zitiert am 24.07.17. Verfügbar auf: <http://www.biosyn.com/tew/taqman-vs-sybr-green-chemistries.aspx>.
164. QuantaBio, *qScript microRNA cDNA Synthesis Kit*. Reverse transcribe small, single-stranded RNAs with superior sensitivity. [Internetquelle]. Zitiert am 24.07.17. Verfügbar auf <http://www.quantabio.com/qscript-microrna-cdna-synthesis-kit>.
165. Wotschovsky, Z., et al., *Reference genes for the relative quantification of microRNAs in renal cell carcinomas and their metastases*. Anal Biochem, 2011. **417**(2): p. 233.

166. Peltier, H.J. and G.J. Latham, *Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues*. RNA, 2008. **14**(5): p. 844.
167. Jung, M., et al., *MicroRNA profiling of clear cell renal cell cancer identifies a robust signature to define renal malignancy*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(9B): p. 3918.
168. Weng, L., et al., *MicroRNA profiling of clear cell renal cell carcinoma by whole-genome small RNA deep sequencing of paired frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens*. J Pathol, 2010. **222**(1): p. 41.
169. Li, Y.C., et al., *[Correlation between tag single nucleotide polymorphisms of microRNA regulatory genes and the genetic susceptibility of primary liver cancer]*. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi, 2012. **46**(6): p. 533.
170. Hu, J., et al., *Human miR-1228 as a stable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs in cancer patients*. Int J Cancer, 2014. **135**(5): p. 1187.
171. Ishihara, T., et al., *Expression of the tumor suppressive miRNA-23b/27b cluster is a good prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma*. J Urol, 2014. **192**(6): p. 1822.
172. Liu, W., et al., *miR-23b targets proline oxidase, a novel tumor suppressor protein in renal cancer*. Oncogene, 2010. **29**(35): p. 4914.
173. Zaman, M.S., et al., *Inhibition of PTEN gene expression by oncogenic miR-23b-3p in renal cancer*. PLoS One, 2012. **7**(11): e50203.
174. Zheng, H., et al., *miR-23a inhibits E-cadherin expression and is regulated by AP-1 and NFAT4 complex during Fas-induced EMT in gastrointestinal cancer*. Carcinogenesis, 2014. **35**(1): p. 173.
175. An, J., et al., *MiR-23a in amplified 19p13.13 loci targets metallothionein 2A and promotes growth in gastric cancer cells*. J Cell Biochem, 2013. **114**(9): p. 2160.
176. Zhu, L., et al., *[Effect of blocking endogenous miR-23a on the proliferation and invasion in gastric adenocarcinoma cell line MGC803]*. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2013. **33**(5): p. 678.
177. Cao, M., et al., *MiR-23a regulates TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition by targeting E-cadherin in lung cancer cells*. Int J Oncol, 2012. **41**(3): p. 869.
178. Tan, X., et al., *cAMP response element-binding protein promotes gliomagenesis by modulating the expression of oncogenic microRNA-23a*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(39): p. 15805.
179. Tang, H.L., et al., *[Expression and clinical significance of miR-23a and metastasis suppressor 1 in colon carcinoma]*. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi, 2012. **41**(1): p. 28.
180. Quan, J., et al., *Oncogenic miR-23a-5p is associated with cellular function in RCC*. Mol Med Rep, 2017.
181. Hu, H., et al., *ATM is down-regulated by N-Myc-regulated microRNA-421*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(4): p. 1506.
182. Sun, X., A. Sit, and M.W. Feinberg, *Role of miR-181 family in regulating vascular inflammation and immunity*. Trends Cardiovasc Med, 2014. **24**(3): p. 105.
183. Cui, M., et al., *Association of microRNA-181c expression with the progression and prognosis of human gastric carcinoma*. Hepatogastroenterology, 2013. **60**(125): p. 961.
184. Huang, P., et al., *MicroRNA-181 functions as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer (NSCLC) by targeting Bcl-2*. Tumour Biol, 2014.

185. Jones, K.B., et al., *miRNA signatures associate with pathogenesis and progression of osteosarcoma*. *Cancer Res*, 2012. **72**(7): p. 1865.
186. Li, Y., et al., *MiR-181c modulates the proliferation, migration, and invasion of neuroblastoma cells by targeting Smad7*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2014. **46**(1): p. 48.
187. Tong, S.J., et al., *microRNA-181 promotes prostate cancer cell proliferation by regulating DAX-1 expression*. *Exp Ther Med*, 2014. **8**(4): p. 1296.
188. Wang, F., et al., *MiRNA-181c inhibits EGFR-signaling-dependent MMP9 activation via suppressing Akt phosphorylation in glioblastoma*. *Tumour Biol*, 2014. **35**(9): p. 8653.
189. Wang, Y., et al., *Transforming growth factor-beta regulates the sphere-initiating stem cell-like feature in breast cancer through miRNA-181 and ATM*. *Oncogene*, 2011. **30**(12): p. 1470.
190. Weng, H., et al., *The pathological role and prognostic impact of miR-181 in acute myeloid leukemia*. *Cancer Genet*, 2015.
191. Yang, C.C., et al., *miR-181 as a putative biomarker for lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma*. *J Oral Pathol Med*, 2011. **40**(5): p. 397.
192. Zhou, W.Y., et al., *MicroRNA-181 targets Yin Yang 1 expression and inhibits cervical cancer progression*. *Mol Med Rep*, 2015. **11**(6): p. 4541.
193. Ji, D., et al., *MicroRNA-181a promotes tumor growth and liver metastasis in colorectal cancer by targeting the tumor suppressor WIF-1*. *Mol Cancer*, 2014. **13**: p. 86.
194. Youssef, Y.M., et al., *Accurate molecular classification of kidney cancer subtypes using microRNA signature*. *Eur Urol*, 2011. **59**(5): p. 721.
195. Lopez-Lago, M.A., et al., *Genomic deregulation during metastasis of renal cell carcinoma implements a myofibroblast-like program of gene expression*. *Cancer Res*, 2010. **70**(23): p. 9682.
196. Ventura, A., et al., *Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters*. *Cell*, 2008. **132**(5): p. 875.
197. Hsieh, I.S., et al., *MicroRNA-320 suppresses the stem cell-like characteristics of prostate cancer cells by downregulating the Wnt/beta-catenin signaling pathway*. *Carcinogenesis*, 2013. **34**(3): p. 530.
198. Wan, L.Y., et al., *miR-320 enhances the sensitivity of human colon cancer cells to chemoradiotherapy in vitro by targeting FOXM1*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **457**(2): p. 125.
199. Wang, X., et al., *MicroRNA-320c inhibits tumorous behaviors of bladder cancer by targeting Cyclin-dependent kinase 6*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2014. **33**(1): p. 69.
200. Duan, H., et al., *MiR-320 and miR-494 affect cell cycles of primary murine bronchial epithelial cells exposed to benzo[a]pyrene*. *Toxicol In Vitro*, 2010. **24**(3): p. 928.
201. Duan, Z., et al., *Epigenetic regulation of protein-coding and microRNA genes by the Gfi1-interacting tumor suppressor PRDM5*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(19): p. 6889.
202. Hershkovitz-Rokah, O., et al., *Restoration of miR-424 suppresses BCR-ABL activity and sensitizes CML cells to imatinib treatment*. *Cancer Lett*, 2015.
203. Donnem, T., et al., *MicroRNA signatures in tumor tissue related to angiogenesis in non-small cell lung cancer*. *PLoS One*, 2012. **7**(1): e29671.
204. Llobet-Navas, D., et al., *The microRNA 424/503 cluster reduces CDC25A expression during cell cycle arrest imposed by transforming growth factor beta in mammary epithelial cells*. *Mol Cell Biol*, 2014. **34**(23): p. 4216.

-
205. Faraoni, I., et al., *MiR-424 and miR-155 deregulated expression in cytogenetically normal acute myeloid leukaemia: correlation with NPM1 and FLT3 mutation status*. *J Hematol Oncol*, 2012. **5**: p. 26.
 206. Berg, V., et al., *miRs-138 and -424 control palmitoylation-dependent CD95-mediated cell death by targeting acyl protein thioesterases 1 and 2 in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2015.
 207. Qu, Y., S. Dang, and P. Hou, *Gene methylation in gastric cancer*. *Clin Chim Acta*, 2013. **424**: p. 53.
 208. Wu, K., et al., *MicroRNA-424-5p suppresses the expression of SOCS6 in pancreatic cancer*. *Pathol Oncol Res*, 2013. **19**(4): p. 739.
 209. Zhang, Y., et al., *MiR-424-5p reversed epithelial-mesenchymal transition of anchorage-independent HCC cells by directly targeting ICAT and suppressed HCC progression*. *Sci Rep*, 2014. **4**: p. 6248.
 210. Wang, Y.X., et al., *Initial study of microRNA expression profiles of colonic cancer without lymph node metastasis*. *J Dig Dis*, 2010. **11**(1): p. 50.
 211. Long, X.H., et al., *Tumor suppressive microRNA-424 inhibits osteosarcoma cell migration and invasion via targeting fatty acid synthase*. *Exp Ther Med*, 2013. **5**(4): p. 1048.
 212. Park, Y.T., et al., *MicroRNAs overexpressed in ovarian ALDH1-positive cells are associated with chemoresistance*. *J Ovarian Res*, 2013. **6**(1): p. 18.
 213. Xu, J., et al., *Suppressed miR-424 expression via upregulation of target gene Chk1 contributes to the progression of cervical cancer*. *Oncogene*, 2013. **32**(8): p. 976.
 214. Banyard, J., et al., *Regulation of epithelial plasticity by miR-424 and miR-200 in a new prostate cancer metastasis model*. *Sci Rep*, 2013. **3**: p. 3151.
 215. Ratert, N., et al., *Reference miRNAs for miRNAome analysis of urothelial carcinomas*. *PLoS One*, 2012. **7**(6): e39309.
 216. Chen, B., et al., *Simultaneously expressed miR-424 and miR-381 synergistically suppress the proliferation and survival of renal cancer cells---Cdc2 activity is up-regulated by targeting WEE1*. *Clinics (Sao Paulo)*, 2013. **68**(6): p. 825.
 217. Gowrishankar, B., et al., *MicroRNA expression signatures of stage, grade, and progression in clear cell RCC*. *Cancer Biol Ther*, 2014. **15**(3): p. 329.
 218. Mestdagh, P., et al., *Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study*. *Nat Methods*, 2014. **11**(8): p. 809.
 219. Ryan, B.M., A.I. Robles, and C.C. Harris, *Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research*. *Nat Rev Cancer*, 2010. **10**(6): p. 389.

8 ANHANG

8.1 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1. ISUP-Vancouver-Klassifikation von Nierenzellkarzinomen.....	6
Tabelle 2. Therapiealgorithmus für die operative Versorgung des NZK.....	9
Tabelle 3. Behandlungen der Zellen.	34
Tabelle 4. Behandlungen der Zellen.	35
Tabelle 5. Behandlungen der Zellen.	36
Tabelle 6. Behandlungen der Zellen.	37
Tabelle 7. Herstellung eines CIP Master Mix.	40
Tabelle 8. Herstellung eines Ligation Master Mix.	40
Tabelle 9. Herstellung von 7 µl RT Master Mix.	45
Tabelle 10. Thermocycler-Einstellungen für die RT-Reaktion.	46
Tabelle 11. Reaktionszusammensetzung für die qRT-PCR-Reaktion.	46
Tabelle 12. Reaktionsbedingungen für die qRT-PCR-Reaktion am <i>LightCycler 480</i>	46
Tabelle 13. Herstellung des RT-Master Mix für die Präamplifikationsreaktion.....	47
Tabelle 14. Thermocycler-Einstellungen für die RT-Reaktion.	48
Tabelle 15. Herstellung eines PreAmp Reaktionsansatzes.....	48
Tabelle 16. Thermocycler-Einstellungen für die Präamplifikationsreaktion.	48
Tabelle 17. Schritt 1:Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Poly-(A)- <i>Tailing</i> -Reaktion.....	50
Tabelle 18. Schritt 1: Thermocyclerbedingungen für die Poly-(A)- <i>Tailing</i> -Reaktion.	50
Tabelle 19. Schritt 2: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die RT-Reaktion.....	50
Tabelle 20. Thermocycler-Bedingungen für die RT-Reaktion.....	50
Tabelle 21. Schritt 3: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die qRT-PCR-Reaktion.	51
Tabelle 22. Schritt 3: Reaktionsbedingungen für die qRT-PCR-Reaktion am <i>Lightcycler</i>	51
Tabelle 23. Transfektionsproben	63
Tabelle 24. Übersicht über die Effekte, die durch den CaSR und die miRNA 23a-Inhibition in primären NZK-Zellen und in 786-O-Zellen induziert werden.....	79

8.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1. Krebserkrankungen nach prozentualer Häufigkeit in Deutschland.....	3
Abbildung 2. Tumorstadien des Nierenzellkarzinoms.....	5
Abbildung 3. Mögliche sequenzielle Therapie des metastasierten NZK mit <i>smart drugs</i>	11
Abbildung 4. <i>multistep</i> -Prozess der Metastasierung beispielhaft für Lungenmetastasen.....	16
Abbildung 5. <i>circulus vitiosus</i> der Knochenmetastasierung.	22
Abbildung 6. Mechanismus der Expression von miRNA	25
Abbildung 7. Verteilung der Zellen 1 ^T - 6 ^T auf eine 6-Well-Schale	35
Abbildung 8. Ablauf einer PCR in drei Schritten: Denaturierung, Annealing und Amplifikation	42
Abbildung 9. Mechanismus des TaqMan miRNA Assays	44
Abbildung 10. Grundprinzip des <i>TaqMan</i> -MasterMix.....	45
Abbildung 11. Ablauf der reversen Transkriptasereaktion.....	49
Abbildung 12. Verschiedene Vergleichsaspekte, die für die Auswertung der Microarray-..... Expressionsanalyse herangezogen wurden	53
Abbildung 13. Ergebnisse der miRNA-Expressionsanalyse, dargestellt in einer Heatmap	54
Abbildung 14. Ergebnisse der miRNA-Expressionsanalyse, dargestellt in einer Heatmap	55
Abbildung 15. Expression der miRNA 23a in den CaSR-Zellklonen.....	57
Abbildung 16. Expression der miRNA 374b in den CaSR-Zellklonen.....	58
Abbildung 17. Expression der miRNA 181c in den CaSR-Zellklonen.....	59
Abbildung 18. Expression der miRNA 320c in den CaSR-Zellklonen.....	60
Abbildung 19. Expression der miRNA 424 in den CaSR-Zellklonen.....	61
Abbildung 20. Die miRNA 23a-Expression bei Hemmung des CaSR	62
Abbildung 21. miRNA 23a-Expression nach Transfektion mit miRNA 23a-Inhibitor	64
Abbildung 22. Relative Viabilität der pcDNA3-Zellen	66
Abbildung 23. Relative Viabilität der WT-Zellen	67
Abbildung 24. Relative Viabilität des CaSR1-Klons.....	67
Abbildung 25. Relative Viabilität der CaSR4-Klone.....	68
Abbildung 26. Relative Viabilität der pcDNA3-, WT-, CaSR1- und CaSR4-Zellen zum Zeitpunkt t ₄ ...	69
Abbildung 27. Relative Toxizität der pcDNA3-Zellen.....	70
Abbildung 28. Relative Toxizität der WT-Zellen.....	70
Abbildung 29. Relative Toxizität des CaSR1-Klons.....	71
Abbildung 30. Relative Toxizität des CaSR4-Klons.....	71
Abbildung 31. Das Proliferationsverhalten von CaSR-Zellen bei miRNA 23a-Inhibition	72
Abbildung 32. Veranschaulichung der angenommenen These	77

8.3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

abs.	<i>absolute</i>	ELISA	<i>enzyme linked</i>
AP	<i>activator protein</i>		<i>immunosorbent assay</i>
BMP	<i>bone morphogenic proteins</i>	EMT	endothelial-mesenchymale
BrdU	Bromdesoxyuridin		Transition
bzw.	Beziehungsweise	ERK	<i>extracellular</i>
c	Konzentration		<i>signal-related kinase</i>
C	Celsius	<i>et al.</i>	<i>et aliae</i> – und andere
Ca ²⁺	= Ca ²⁺ = Calciumionen = "Calcium"	EZM	Extrazellulärmembran
CaSR	Calcium-sensitiver Rezeptor	FC	<i>Fold Change</i>
CDK	Cyclin-abhängige Kinase	FCS	<i>fetal calf serum</i> – fötales Kälberserum
cDNA	<i>complementary DNA</i>	FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
CLDN	Claudin	5-FU	5-Fluoruracil
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	× g	Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung
Cp	<i>crossing point</i>	GTP	Guanosintriphosphat
CREB	<i>cAMP response</i> <i>element binding protein</i>	GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
dest.	destilliert	HCl	Salzsäure
dNTPs	Desoxynukleotid- Triphosphate	HeLA	menschliche Zellen eines Zervixkarzinoms
DMSO	Dimethylsulfoxid	HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Ig-CAM	<i>immunoglobulin-type cell</i> <i>adhesion molecule</i>
DGCR8	dsDNA Bindeprotein	Inh	miRNA 23a-Inhibitor- transfiziert
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate</i> <i>Buffered Saline</i>	Inf- α	Interferon- α
EDTA	Ethylendiamintetra- essigsäure	IRF	<i>interferon regulatory factor</i>

IRS	Insulinrezeptorsubstrat	NSCLC	<i>non small cell lung cancer</i> =
ISUP	<i>International Society of Urologic Pathologists</i>		nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
JNK	c-Jun N-terminale Kinase	nt	Nukleotidzahl
kNZK	klarzelliges Nierenzellkarzinom	NZK	Nierenzellkarzinom
M	molar	OD	optische Dichte
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>	p53	Tumorprotein 53
m-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>	p.a.	<i>pro analysi</i> – für analytische Zwecke
Mg ²⁺	Magnesiumion	PBS	phosphatgepuffert Salzlösung
mRNA	messenger RNA	pcDNA	pcDNA3 = Leervektor
miRNA	microRNA	PCR	Polymerasekettenreaktion
miRNP	miRNA-bindender Ribonukleoproteinkomplex	PD1	<i>programmed cell death protein</i>
MT	Metallothionein	PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>	PGE-2	Prostaglandin E-2
MTS	<i>metastasis suppressor</i>	PLC	Phospholipase
μ	mykro	PP	Polypropylen
NaCl	Natriumchlorid	<i>pre-miRNA</i>	Vorläufer-microRNA
Neg.	Negativkontrolle	<i>pri-miRNA</i>	primäre microRNA
n.b.	nicht behandelt = weder mit miRNA-23a-Inhibitor noch mit Negativkontrolle transfiziert	PTH	Parathormon
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>	PTHrp	<i>parathyroid hormone-related protein</i>
NPS2143	NPS = CaSR-Inhibitor	qRT-PCR	quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion
		RAN	<i>Ras-related nuclear protein</i>
		RANKL	<i>receptor activator of NF-κB ligand</i>

RKI	Robert-Koch-Institut	V	Volumen
RNA	Ribonukleinsäure	VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
RNAse	Ribonuklease		
rpm	<i>rounds per minute</i> - Umdrehungen pro Minute	VHL	von-Hippel-Lindau
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>	WHO	Weltgesundheitsorganisation
SDS	Sodiumdodecylsulfat	WIF	<i>Wnt inhibitory factor</i>
SNOR	<i>small nuclear RNA</i>	WT	Wildtyp
SNP	<i>single nucleotide polymorphisms</i> – Einzel-Nukleotid-Polymorphismen	z.B.	zum Beispiel
SSGIN	<i>stage, size, grade and necrosis score</i>		
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>		
tf	<i>tissue factor</i>		
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor		
TNM	<i>tumor nodes metastasis</i> – Klassifikation maligner Tumoren		
TSP	Thrombospondin		
UICC	<i>Union for International Cancer control</i>		
UISS	<i>University of California Los Angeles Integrated Staging System</i>		
unbeh	unbehandelt		
untransf	untransfiziert		
3'UTR	3'untranslatierte Region		

8.4 WERTE ZU DEN ABBILDUNGEN

Abbildung 15

miRNA 23a	Relative Expression	Standardabweichung
pcDNA3	1	0
pcDNA3 + Ca ²⁺	0,629	0,082
WT	0,55	0,074
WT + Ca ²⁺	0,338	0,052
CaSR1	0,51	0,048
CaSR1+Ca ²⁺	0,903	0,147
CaSR4	0,661	0,348
CaSR4 + Ca ²⁺	0,892	0,093
CaSR9	0,546	0,041
CaSR9 + Ca ²⁺	0,536	0,043

Abbildung 16

miRNA 374b	Relative Expression	Standardabweichung
pcDNA3	1	0
pcDNA3 + Ca ²⁺	0,868	0,351
WT	1,283	0,437
WT + Ca ²⁺	1,313	0,526
CaSR1	1,116	0,675
CaSR1+Ca ²⁺	1,181	0,292
CaSR4	0,688	0,306
CaSR4 + Ca ²⁺	0,970	0,473
CaSR9	0,926	0,494
CaSR9 + Ca ²⁺	0,647	0,146

Abbildung 17

miRNA 181c	Relative Expression	Standardabweichung
pcDNA3	1	0
pcDNA3 + Ca ²⁺	0,908	0,243
WT	1,295	0,360
WT + Ca ²⁺	1,201	0,468
CaSR1	1,338	0,841
CaSR1+Ca ²⁺	1,263	0,301
CaSR4	0,698	0,238
CaSR4 + Ca ²⁺	0,638	0,075
CaSR9	0,687	0,231
CaSR9 + Ca ²⁺	0,635	0,122

Abbildung 18

miRNA 320c	Relative Expression	Standardabweichung
pcDNA3	1	0
pcDNA3 + Ca ²⁺	1,144	0,242
WT	1,075	0,293
WT + Ca ²⁺	1,017	0,178
CaSR1	0,951	0,268
CaSR1+Ca ²⁺	0,966	0,131
CaSR4	0,759	0,308
CaSR4 + Ca ²⁺	0,696	0,009
CaSR9	0,849	0,068
CaSR9 + Ca ²⁺	0,863	0,205

Abbildung 19

miRNA 424	Relative Expression	Standardabweichung
pcDNA3	1	0
pcDNA3 + Ca ²⁺	0,80538	0,570
WT	1,577	0,123
WT + Ca ²⁺	1,517	0,204
CaSR1	1,543	0,522
CaSR1+Ca ²⁺	1,577	0,223
CaSR4	0,776	0,046
CaSR4 + Ca ²⁺	0,905	0,180
CaSR9	0,552	0,018
CaSR9 + Ca ²⁺	0,401	0,208

Abbildung 20

miRNA 23a	Relative Expression
pcDNA3	1
pcDNA3 + Ca ²⁺	1,220
pcDNA3 + NPS2143	0,801
pcDNA3 + NPS2143 + Ca ²⁺	0,830
WT	0,398
WT + Ca ²⁺	0,535
WT+ NPS2143	1,350
WT	0,830
CaSR1	1,973
CaSR1+Ca ²⁺	6,580
CaSR1+ NPS2143	2,098
CaSR1+ NPS2143 + Ca ²	3,833
CaSR4	0,869
CaSR4 + Ca ²⁺	2,471
CaSR4+ NPS2143	0,757
CaSR4+ NPS2143 + Ca ²	1,280

Abbildung 21

Inkubationsdauer	miRNA 23a	Relative Expression
24h	Inh	2,265
	Inh + Ca ²⁺	3,703
	Neg	0,0176
	Neg + Ca ²⁺	0,0346
	n.b.	1
	n.b. + Ca ²⁺	3,127
48 h	Inh	1,568
	Inh + Ca ²⁺	2,609
	Neg	0,035
	Neg + Ca ²⁺	0,031
	n.b.	1
	n.b.+ Ca ²⁺	2,186

Abbildung 22

pcDNA3	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅	t ₆	t ₇	t ₈	t ₉
Inh	0,017	1	1,006	1,595	1,671	2,242	2,446	2,397	2,62	2,516
Inh + Ca ²⁺	0,040	1	0,906	1,518	1,660	2,199	2,439	2,270	2,587	2,573
Neg	0,015	1	1,012	1,691	1,841	2,425	2,700	2,657	2,915	2,868
Neg + Ca ²⁺	0,043	1	0,976	1,546	1,753	2,343	2,622	2,494	2,881	2,773
n.b.	0,007	1	1,015	1,705	1,742	2,402	2,582	2,523	2,785	2,651
n.b.+ Ca ²⁺	0,028	1	1,074	1,551	1,732	2,422	2,526	2,505	2,794	2,616

Abbildung 23

WT	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅	t ₆	t ₇	t ₈	t ₉
Inh	0,065	1	0,947	1,540	1,730	2,115	2,348	2,265	2,459	2,405
Inh + Ca ²⁺	0,087	1	0,971	1,488	1,650	2,155	2,364	2,287	2,528	2,464
Neg	0,049	1	1,105	1,780	2,056	2,454	2,684	2,526	2,796	2,675
Neg + Ca ²⁺	0,086	1	1,072	1,477	1,546	2,048	2,298	2,271	2,564	2,467
n.b.	0,048	1	1,025	1,713	1,890	2,347	2,497	2,388	2,633	2,492
n.b. + Ca ²⁺	0,077	1	1,074	1,533	1,810	2,240	2,506	2,416	2,701	2,586

Abbildung 24

CaSR1	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅	t ₆	t ₇	t ₈	t ₉
Inh	0,173	1	0,897	1,379	1,696	2,046	2,303	2,197	2,395	2,342
Inh + Ca ²⁺	0,209	1	0,898	1,221	1,468	1,875	2,170	2,154	2,354	2,331
Neg	0,182	1	1,089	1,546	1,941	2,171	2,519	2,381	2,627	2,428
Neg + Ca ²⁺	0,225	1	0,966	1,395	1,774	2,095	2,406	2,300	2,567	2,369
n.b.	0,151	1	1,091	1,652	1,977	2,241	2,524	2,374	2,671	2,528
n.b. + Ca ²⁺	0,210	1	0,991	1,434	1,784	2,038	2,357	2,239	2,540	2,3846

Abbildung 25

CaSR4	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅	t ₆	t ₇	t ₈	t ₉
Inh	0,233	1	1,041	1,386	1,742	1,962	2,173	2,020	2,180	2,175
Inh + Ca ²⁺	0,250	1	0,898	1,145	1,281	1,679	1,944	1,923	2,075	2,119
Neg	0,271	1	1,066	1,444	1,892	2,117	2,408	2,268	2,528	2,438
Neg + Ca ²⁺	0,314	1	0,904	1,196	1,376	1,767	2,006	2,103	2,237	2,229
n.b.	0,262	1	0,986	1,519	1,914	2,090	2,329	2,251	2,552	2,449
n.b.+ Ca ²⁺	0,336	1	0,930	1,216	1,392	1,793	2,097	2,149	2,382	2,334

Abbildung 26

Zellbehandlung		Relative Viabilität zum Zeitpunkt t ₅	
pcDNA3		n.b.	2,402
		Neg	2,425
		Inh	2,242
	+ Ca ²⁺	n.b.	2,422
		Neg	2,343
		Inh	2,199
WT		n.b.	2,347
		Neg	2,454
		Inh	2,115
	+Ca ²⁺	n.b.	2,240
		Neg	2,048
		Inh	2,199
CaSR4		n.b.	2,374
		Neg	2,171
		Inh	2,046
	+Ca ²⁺	n.b.	2,239
		Neg	2,095
		Inh	1,875
CaSR9		n.b.	2,090
		Neg	2,117
		Inh	1,962
	+Ca ²⁺	n.b.	1,793
		Neg	1,767
		Inh	1,679

Abbildung 27

pcDNA3	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅	t ₆	t ₇	t ₈	t ₉
Inh	1	0,976	1,022	1,022	0,992	0,981	0,906	0,890
Inh + Ca ²⁺	1	0,971	0,993	0,993	0,929	0,954	0,942	0,940
Neg	1	1,004	1,004	1,004	0,992	1,020	1,004	1,016
Neg + Ca ²⁺	1	0,980	0,989	0,989	0,928	0,961	0,942	0,927
n.b.	1	1,001	1,058	1,058	1,049	1,079	1,081	1,075
n.b. + Ca ²⁺	1	0,950	0,969	0,969	0,936	0,957	0,947	0,939

Abbildung 28

WT	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅	t ₆	t ₇	t ₈	t ₉
Inh	1	0,942	0,944	0,944	0,904	0,930	0,920	0,896
Inh + Ca ²⁺	1	0,943	0,962	0,962	0,939	0,994	0,965	0,959
Neg	1	0,947	0,971	0,971	0,937	0,962	0,950	0,943
Neg + Ca ²⁺	1	0,907	0,928	0,928	0,879	0,890	0,950	0,850
n.b.	1	0,970	0,996	0,996	0,978	0,960	0,952	0,940
n.b. + Ca ²⁺	1	0,945	0,976	0,976	0,936	0,955	0,930	0,929

Abbildung 29

CaSR1	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅	t ₆	t ₇	t ₈	t ₉
Inh	1	0,995	0,985	0,985	0,967	0,984	0,976	0,964
Inh + Ca ²⁺	1	0,972	0,990	0,990	0,960	0,977	0,961	0,957
Neg	1	0,977	0,988	0,988	0,950	0,977	0,983	0,999
Neg + Ca ²⁺	1	0,973	0,992	0,992	0,963	0,982	0,992	0,969
n.b.	1	0,964	0,970	0,969	0,893	0,929	0,913	0,924
n.b.+ Ca ²⁺	1	0,950	0,976	0,976	0,918	0,938	0,910	0,937

Abbildung 30

CaSR4	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅	t ₆	t ₇	t ₈	t ₉
Inh	1	0,980	0,994	0,994	0,974	0,992	0,985	0,974
Inh + Ca ²⁺	1	0,971	1,000	1,000	0,980	0,994	0,981	0,962
Neg	1	0,927	0,948	0,948	0,924	0,933	0,921	0,923
Neg + Ca ²⁺	1	0,970	0,983	0,983	0,942	0,962	0,922	0,937
n.b.	1	0,943	0,966	0,966	0,872	0,884	0,871	0,863
n.b. + Ca ²⁺	1	0,945	0,972	0,972	0,928	0,943	0,930	0,927

Abbildung 30

Zellbehandlung		Relative Toxizität zum Zeitpunkt t_5	
pcDNA3		untransf	1,058
		Neg	1,004
		Inh	1,022
	+ Ca ²⁺	untransf	0,969
		Neg	0,989
		Inh	0,993
WT		untransf	0,996
		Neg	0,971
		Inh	0,944
	+Ca ²⁺	untransf	0,976
		Neg	0,928
		Inh	0,962
CaSR4		untransf	0,969
		Neg	0,988
		Inh	0,985
	+Ca ²⁺	untransf	0,976
		Neg	0,992
		Inh	0,990
CaSR9		untransf	0,966
		Neg	0,948
		Inh	0,994
	+Ca ²⁺	untransf	0,972
		Neg	0,983
		Inh	1,000

8.5 DANKSAGUNG

In der Online-Version entfernt

8.6 LEBENSLAUF

In der Online-Version entfernt