

**Einfluss des Calcium-sensitiven Rezeptors
auf knochenspezifische
Metastasierungsprozesse des
Nierenzellkarzinoms**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg Universität

Mainz

Tobias Haber

geboren am 31.05.1982 in Wiesbaden

Wiesbaden, Juli 2015

Dekan:

1. Berichterstatterin:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 04.11.2015

**"Now we take our time, so nonchalant
And spend our nights so bon vivant
We dress our days in silken robes
The money comes
The money goes
We know it's all a passing phase..."**

("I've loved these days" by Billy Joel)

Inhaltsverzeichnis	
1	Einleitung..... 1
1.1	Das Nierenzellkarzinom..... 1
1.1.1	Epidemiologie..... 1
1.1.2	Histopathologie und klinische Klassifikation..... 2
1.1.3	Pathogenese..... 3
1.1.4	Diagnostik des NZK..... 5
1.1.5	Prognose..... 6
1.1.6	Therapieformen..... 7
1.2	Grundlagen der Metastasierung..... 10
1.2.1	Die Metastasierung - ein <i>Multistep</i> -Prozess..... 11
1.2.2	Hintergründe der NZK-Metastasierung..... 13
1.2.3	Organspezifische Metastasierung..... 16
1.2.4	Hypothesen der organspezifischen Metastasierung..... 18
1.2.5	Der Calcium-sensitive Rezeptor..... 19
1.2.6	Die Rolle des CaSR in der Knochenmetastasierung..... 23
1.3	Zielsetzung..... 28
2	Material und Methoden..... 30
2.1	Material und Reagenzien..... 30
2.1.1	Chemikalienliste..... 30
2.1.2	Puffer und Lösungen..... 31
2.1.3	Verbrauchsmaterialien..... 34
2.1.4	Gebrauchsmaterialien..... 35
2.1.5	Geräte..... 35
2.1.6	Kits..... 36
2.1.7	Vektoren..... 36
2.1.8	Enzyme..... 37
2.1.9	Oligonukleotide..... 38
2.1.10	Antikörper..... 38
2.1.11	Zelllinien..... 39
2.1.12	Bakterienstämme..... 40
2.1.13	Gewebeproben..... 40
2.2	Methoden..... 40

2.2.1	Molekularbiologische Methoden	40
2.2.2	Zellbiologische Methoden.....	56
2.2.3	Statistische Auswertungen.....	76
3	Ergebnisse.....	77
3.1	CaSR-Transfektion von Nierenzellen	77
3.1.1	Primerdesign.....	77
3.1.2	Die Transfektion der Transgene.....	81
3.2	Der Einfluss des Calcium-sensitiven Rezeptors auf die knochenspezifische Metastasierung.....	87
3.2.1	Die Auswirkungen einer erhöhten CaSR-Expression auf die Mechanismen der Metastasierung.....	87
3.2.2	Die Auswirkungen einer Behandlung mit Calcium auf CaSR-transfizierte Zellen	95
3.2.3	Phospho Kinase-Array – Bestimmung relevanter Signalwege.....	110
3.2.4	Relevante Signalmediatoren der Migration, Adhäsion und Proliferation	113
4	Diskussion.....	130
4.1	Die knochenspezifische Metastasierung	130
4.2	Ausblick	159
5	Zusammenfassung.....	162
6	Summary.....	164
7	Literaturverzeichnis.....	166
8	Anhang.....	178
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	178
8.2	Abbildungsverzeichnis	181
8.3	Tabellenverzeichnis	183
8.4	Werte zu den Abbildungen.....	184
8.5	Lebenslauf.....	195
8.6	Publikationen und Kongressbeiträge	196
8.6.1	Publikationen	196
8.6.2	Kongressbeiträge	196
8.6.3	Danksagung	198

1 Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Mit etwa 340.000 jährlichen Neuerkrankungen belegt das Nierenzellkarzinom (NZK) den neunten Platz der am häufigsten auftretenden Krebserkrankungen bei Männern und den 14. Platz bei Frauen weltweit (Jonasch et al., 2014; Znaor et al., 2014). Zwar macht das NZK nur etwa 3 % aller Tumorerkrankungen aus, ist aber mit etwa 85 % die häufigste maligne Erkrankung der Niere (Fornara et al., 2011). Neben einer altersabhängigen Inzidenz, die ab dem 35. Lebensjahr kontinuierlich ansteigt und den Höhepunkt im 6. – 8. Lebensjahrzent erreicht, gibt es auch geografische und ethnische Unterschiede (Krebsregisterdaten, 2011). Hierbei sind Menschen aus industriell fortgeschrittenen Regionen wie z.B. Nordamerika und Europa deutlich stärker gefährdet am NZK zu erkranken als Menschen aus Asien bzw. Afrika (Znaor et al., 2014) (Abbildung 1).

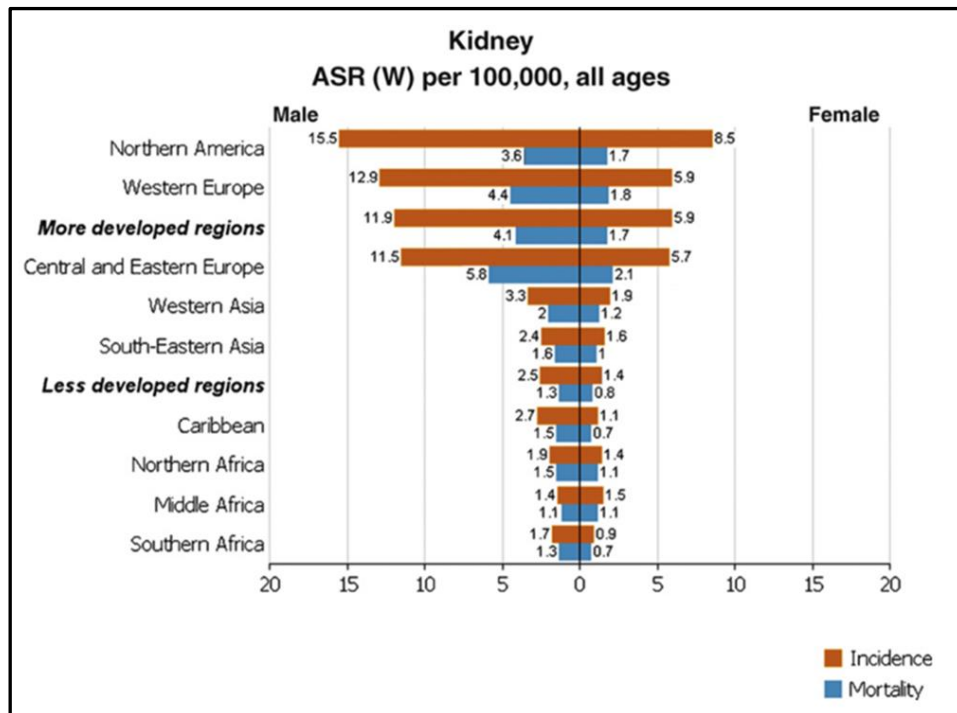


Abbildung 1: Inzidenzraten des Nierenzellkarzinoms weltweit. ASR = Age.-standardised rates. Modifiziert nach (Ljungberg et al., 2011).

1.1.2 Histopathologie und klinische Klassifikation

Unter Nierenkrebs versteht man eine bösartige Erkrankung des Nierenparenchyms, die an verschiedenen Stellen des Nephrons entstehen kann (Abbildung 2). Nach der Heidelberg-Klassifizierung lassen sich vier große Subtypen histologisch unterscheiden: Die häufigste Form des NZK ist das klarzellige NZK mit einem Auftreten von etwa 70 % - 80 %. Charakteristisch für das klarzellige NZK sind das klare Zytoplasma nach Hämatoxylin-Eosin-(HE-) Färbung sowie feine Gefäßaufzweigungen (Buentig et al., 2002). Mit etwa 10 % - 15 % ist der papilläre Subtyp die zweithäufigste Form des NZK und zeichnet sich unter anderem durch Unterschiede in der Anfärbung des Zytoplasmas sowie durch eine hauptsächlich papilläre Wachstumsform aus. Sowohl klarzelliges als auch papilläres NZK haben ihren Ursprung in den proximalen Tubulusepithelzellen der Niere (Abbildung 2). Chromophobe NZK (~5 %) zeichnen sich durch ein solides Wachstumsmuster und chromophobe Charakteristika nach HE-Färbung aus. Mit einer Häufigkeit von 1 % ist das Sammelrohrkarzinom oder auch Ductus-Bellini-Karzinom der seltenste der vier Subtypen. Weiterhin gibt es noch eine Vielzahl nicht klassifizierbarer NZK, die aufgrund von genetischen Veränderungen, oder aber ihrer Morphologie keinem der zuvor genannten Subtypen zugeordnet werden können. Nicht klassifizierbare Subtypen treten mit einer Häufigkeit von 3 % - 5 % auf. (Buentig et al., 2002; Cairns, 2010; Crumley et al., 2013; Rydzanicz et al., 2013). Neben der histopathologischen Einteilung lassen sich die verschiedenen Formen des NZK auch durch genetische Veränderungen unterscheiden. Die sogenannten Biomarker und auch die histopathologische Klassifizierung werden im folgenden Abschnitt genauer diskutiert.

Die klinische Klassifikation des NZK erfolgt auf der Basis der TNM- (*TNM Classification of Malignant Tumours*) der UICC- (*Union for International Cancer Control*) Kriterien. Hierbei werden neben Kriterien, die sich auf die Größe des Primärtumors bzw. die Infiltration von renalen Nachbargeweben (T1a-T4 = *Tumor*) und der Klassifizierung von Lymphknoten- und Fernmetastasen (N0 - N2 = *Nodes*; M0 - M1 = *Metastases*) beziehen, Veränderungen der Zellen und Zellkerne in verschiedene Tumorgrade unterteilt (G1- G3 = *Grading*) (Bedke et al., 2010; Fuhrman et al., 1982).

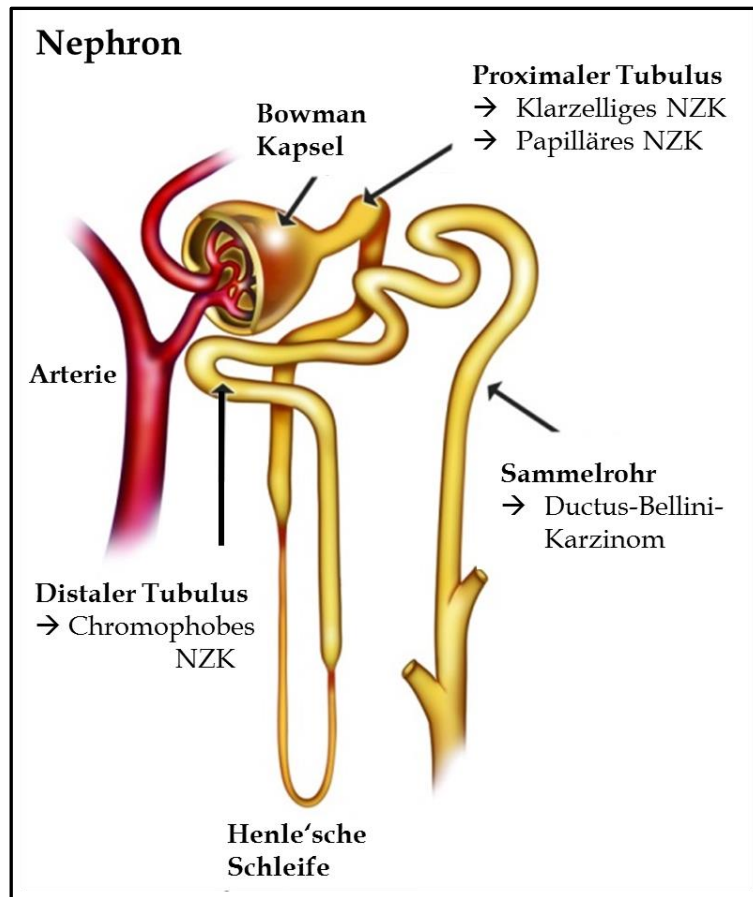


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Nephron-/Sammelrohrsystems. Die Subtypen des NZK sind ihrem Ursprungsort zugeordnet. Modifiziert nach (Albiges et al., 2012).

1.1.3 Pathogenese

Der Großteil aller diagnostizierten NZK wird durch Risikofaktoren wie z.B. Rauchen, Adipositas, Hypertonie, aber auch Bestrahlung und Notwendigkeit einer Dialyse bei chronischem Nierenversagen ausgelöst (Cohen et al., 2005; Haferkamp et al., 2006; Ljungberg et al., 2011; Ngo et al., 2014). Der weitaus geringere Anteil an NZK-Neuerkrankungen (3 % - 5 %) wird durch hereditäre Prädisposition verursacht, wobei das von Hippel-Lindau (VHL)-Syndrom den größten Risikofaktor darstellt. Bei nahezu allen Patienten mit VHL-Syndrom kann eine Mutation des VHL-Gens auf Chromosom 3p²⁵⁻²⁶ nachgewiesen werden (Haas et al., 2014).

Unter natürlichen Bedingungen dient das Genprodukt von VHL als Komplexor mit Elongin B und C, Cullin 2 und Rbx als Teil eines E3-Ligase-Komplexes der Ubiquitinierung von Proteinen, die dann vom zelleigenen Proteasom degradiert werden

(Clark, 2009; Lisztwan et al., 1999). Unter normoxischen Bedingungen bindet HIF1- α an den E3-Ligase-Komplex, wird ubiquitinyliert und schließlich vom Proteasom degradiert. Unter hypoxischen Bedingungen können die Seitenketten der HIF α -Untereinheit nicht hydroxyliert werden (Abbildung 3). Dadurch wird die Komplexbildung mit der E3-Ligase verhindert und die Ubiquitinylierung bleibt aus. Durch eine Agglomeration vieler HIF α - und HIF β -Moleküle wird die Transkription verschiedener regulatorischer Proteine wie z.B. *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *platelet derived growth factor* (PDGF) und *endothelial growth factor* (EGF) angeregt, Zellprozesse wie Angiogenese, Proliferation und Migration zu fördern (Abbildung 3) (Maher et al., 2011). Hohe HIF-Spiegel manifestieren sich jedoch nicht nur bei hypoxischen Bedingungen sondern sind auch das Produkt genetischer Alterationen wie beispielsweise beim VHL-Syndrom. Es handelt sich hierbei um eine autosomal dominante Erbkrankheit, die durch Ausbildung einer Vielzahl von Tumoren charakterisiert ist. Neben der Entwicklung von Tumoren in Pankreas, Hirn und Retina, haben Patienten mit VHL-Syndrom ein etwa 50 %-iges Risiko der Ausbildung eines NZK, welches häufig bilateral und multifokal auftritt (Clark, 2009; Haas and Nathanson, 2014). Dabei sind nach jetzigen Erkenntnissen nur die Typen I und 2B an der Entstehung von NZK beteiligt. In 30 % - 40 % aller Fälle konnten Keimzellmutationen als Ursache der Prädisposition gefunden werden. In den übrigen Fällen sind entweder *nonsense*-, *indel*- (*Insertions/Deletions*) oder *missense*-Mutationen an der Ausbildung eines hereditären NZK verantwortlich (Haas and Nathanson, 2014; Maher et al., 2011). Aber auch in der erworbenen Form des klarzelligen NZK konnte bei 60 % - 80 % aller Patienten eine Mutation im VHL-Gen nachgewiesen werden (Maher, 2013; Maher et al., 2011).

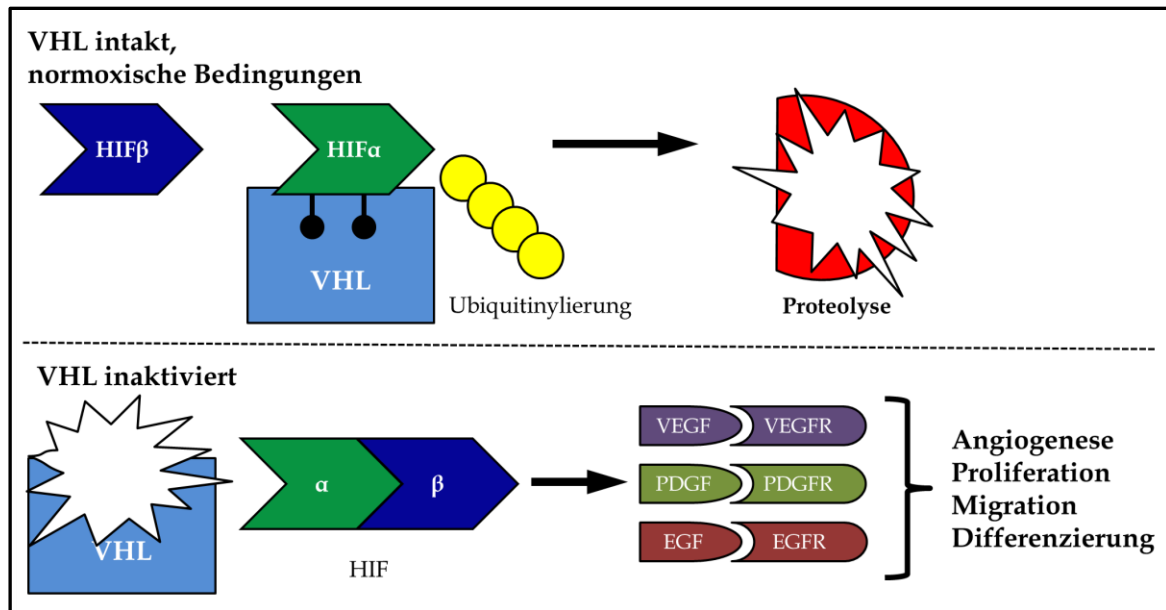


Abbildung 3: Wirkung von aktivem und inaktivem VHL. Unter normoxischen Bedingungen mit intaktem VHL wird HIF1 α nach Bindung an den VHL-Komplex ubiquityniert und vom Proteasom abgebaut. Bei inaktivem VHL kommt es zur Ausbildung von HIF- $\alpha\beta$ -Heterodimeren, die verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren und somit wichtige Zellprozesse fördern. Modifiziert nach (Maher et al., 2011).

1.1.4 Diagnostik des NZK

Entgegen der landläufigen Meinung weisen nur etwa 10 % aller Patienten, die am NZK erkrankt sind, die klassischen Symptome wie Hämaturie, Flankenschmerz und seitliche Raumforderung auf. Bei mehr als 40 % der Patienten tritt nur ein bis kein Symptom auf und bei der Mehrzahl der Patienten wird ein NZK zufällig bei einer Routinekontrolle mit bildgebenden Verfahren diagnostiziert (Cairns, 2010; Haferkamp et al., 2006). Wurde eine sogenannte Raumforderung nachgewiesen, wird mit Hilfe weiterer diagnostischer Verfahren, wie der Magnetresonanztomographie oder der Computertomografie, zwischen benigner und maligner Form unterschieden und der Patient auf Fernmetastasen untersucht (Haferkamp et al., 2006). Wird der Patient bei Erstdiagnose bereits mit Metastasen vorstellig, so manifestieren sich in vielen Fällen sekundäre Symptome, die Metastasierungsort-spezifisch sein können. Lungenmetastasen können Bronchitis, Dyspnoe sowie Hämoptyse und Schmerzen des Brustkorbs auslösen. Bei Knochenmetastasen kommt es häufig zu starken ossären Schmerzen, Hypercalcämie und pathologischen Frakturen (Fourneau et al., 1998; Lumachi et al., 2009).

1.1.5 Prognose

Die Prognosestellung beim NZK ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Sie basiert derzeit stark auf der bereits angesprochenen TNM-Klassifizierung sowie der Einstufung des Subtyps und des Tumorgrads (G-Stadium), soll aber in naher Zukunft durch immunhistologisch prognostische Marker ersetzt werden. Als prognostische Marker haben sich in der Vergangenheit besonders VHL, HIF1- α , VEGF sowie die Carbo-Anhydrase IX und spezifische miRNAs (miR-10b, miR-139-5p, miR-130b und miR199b-5p) ausgezeichnet (Ngo et al., 2014). Neben diesen prognostischen Biomarkern wird die Rolle des Immunsystems bzw. spezieller Immunsystem-Marker, wie z.B. Ki-67, Survivin oder c-Met, zur Zeit stark diskutiert (Birchmeier et al., 2003; Byun et al., 2007; Gherardi et al., 2012; Tollefson et al., 2007).

Patienten mit lokalisiertem klarzelligem Nierenzellkarzinom haben nach operativem Eingriff eine gute Prognose. Durch die Entfernung des Tumors werden 5-Jahres-Überlebensraten von 65 % - 75 % erreicht, in Relation von Größe, Ausdehnung und der Art des Subtyps (Fornara and Hoda, 2011). Bei etwa 25 % - 35 % der Patienten wird bei Erstbefund der Krankheitsverlauf durch das Auftreten von Lokal- und Fernmetastasen verkompliziert. Hierbei sind häufig mehrere Organe gleichzeitig betroffen, wobei Gehirn, Lunge, Leber, Knochen und die Lymphknoten am stärksten befallen sind (Abbildung 4) (Oppenheimer, 2006). Die Ausbildung von Fernmetastasen stellt aufgrund der Resistenz des NZK gegenüber Strahlen- und Chemotherapie ein großes Problem dar. Bei metastasiertem NZK fällt die 5-Jahres-Überlebensrate auf unter 10 % und das mediane Überleben beträgt nur noch 6 - 10 Monate (Flanigan et al., 2003; Fornara and Hoda, 2011).

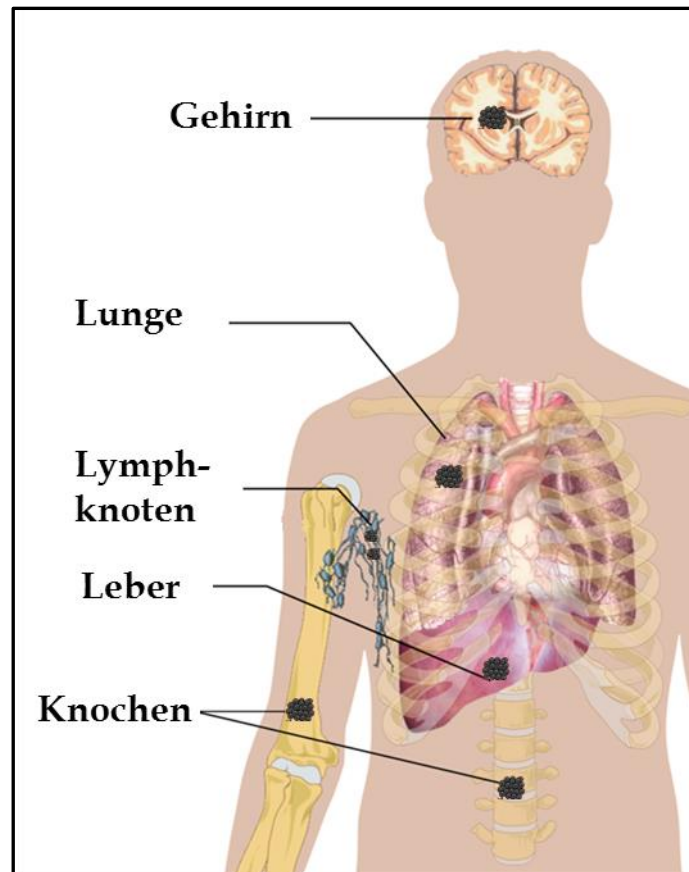


Abbildung 4: Hauptmetastasierungsorte des NZK. Gehirn, Lunge, Lymphknoten, Leber, Knochen. Modifiziert nach <http://libby1970.hubpages.com/hub/What-Is-The-Characteristics-of-Cancer#>.

1.1.6 Therapieformen

1.1.6.1 Operative Maßnahmen

Der chirurgische Eingriff zur Entfernung des primären, lokal begrenzten Nierentumors mitsamt Gerota-Fascia, der Nebenniere und den regionalen Lymphknoten galt bis in die 1980er Jahre, trotz teils schwerwiegender Nebenwirkungen, als alternativlos. Nach dem heutigen Stand der Medizin werden unter idealen Voraussetzungen nierenerhaltende Operationen durchgeführt. Hierfür müssen die Tumoren peripher lokalisiert und etwa unter 7 cm Größe sein, damit eine organerhaltende, sogenannte Konus- oder Keilresektion durchgeführt werden kann (Thuroff et al., 2015). Dabei ist die minimal-invasive, laparoskopische Methode der offen durchgeführten Keilresektion zu bevorzugen, da diese mit einem besseren *Outcome* der Patienten verbunden ist. Liegen zum Zeitpunkt des Eingriffs bereits Fernmetastasen

vor, wird eine Nephrektomie lediglich als Palliativmaßnahme durchgeführt, die mit einer adjuvanten medikamentösen Behandlung einhergeht (Flanigan et al., 2004).

1.1.6.2 Adjuvante und neoadjuvante Therapie beim metastasierten NZK

Aufgrund starker Resistenz gegenüber Strahlen- und Chemotherapie, die auf der Überexpression des MDR (*Multi-Drug-Resistance*) Proteins P-Glykoprotein basiert, sowie häufiger Inoperabilität von stark gestreuten Metastasen sind alternative Therapieansätze beim metastasierten NZK unablässig. Als Standard-Therapie der letzten Jahre wurden Patienten zumeist mit immuntherapeutischen Zytokinen behandelt (Kuczyk et al., 2007; Merseburger et al., 2008).

1.1.6.3 Klassische Immuntherapie

Die Interferon-Monotherapie, die kombinierte Immunchemotherapie (IFN, IL-2 und 5-Fluorouracil) sowie die Hochdosistherapie mit IL-2 galten jahrelang als Standard in der Behandlung des metastasierten NZK. Trotz mangelhafter Standardisierung speziell bei klinischen Studien konnten bei vielen Patienten langanhaltende Effekte beobachtet werden. Die klassische Immuntherapie wird aufgrund neuerer Daten heutzutage allerdings nicht mehr eingesetzt und wurde mittlerweile von Therapien, die Signalwege spezifischer Zellen zielgerichtet hemmen bzw. beeinflussen, ersetzt (Staehler et al., 2010).

1.1.6.4 Targeted Therapie

Die heutigen modernen Therapieformen beziehen sich auf zwei unterschiedliche Signaltransduktionswege, zum einen den Angiogenese-Signalweg und zum anderen den mTOR (*mammalian target of Rapamycin*)- Signalweg (Merseburger and Kuczyk, 2008; Staehler et al., 2010).

Für deren Entwicklung spielten die fortschreitende Erkenntnis der Karzinogenese des NZK und die damit verbundene Beobachtung der VHL-Mutation, die mit einer

Alteration der Gen-Expression von VEGF, PDGF und EGF in den Tumorentitäten verbunden ist, eine entscheidende Rolle. Die sogenannten Multikinaseinhibitoren (MKI) sind in der Lage an der Angiogenese, dem Zellwachstum und am Zellzyklus beteiligte Tyrosinkinasen, sogenannte Rezeptortyrosinkinasen gezielt zu beeinflussen bzw. zu unterbinden und werden deswegen auch Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) genannt (Banyra et al., 2014). Aktuell sind vier verschiedene TKI für die Behandlung des metastasierten NZK als *targeted*-Therapeutikum zugelassen:

1.1.6.4.1 Sorafenib

Sorafenib ist ein MKI, der oral verabreicht wird. Sorafenib kommt speziell dann zum Einsatz, wenn eine vorangegangene Therapie mit Interferon- α oder Interleukin-2 gescheitert ist. Sorafenib inhibiert unter anderem den VEGF- und den PDGF-Signalweg durch Blockierung der jeweiligen Rezeptoren, ist aber auch in der Lage c-Raf (*rapidly accelerated fibrosarcoma*), zu inhibieren (Faivre et al., 2006).

1.1.6.4.2 Sunitinib

Sunitinib ist ein oraler MKI, der als Erstlinien-Therapeutikum zugelassen ist aber auch für die Zweitlinientherapie verwendet wird (Merseburger and Kuczyk, 2008; Papaetis et al., 2009). Es inhibiert hauptsächlich die Rezeptoren für VEGF und PDGF (Abbildung 5).

1.1.6.4.3 Pazopanib

Pazopanib ist seit 2010 von der FDA zur Behandlung von fortgeschrittenem NZK zugelassen und wird ebenfalls zur *First-line*-Therapie eingesetzt (Keisner et al., 2011; Staehler et al., 2010). Pazopanib ist unter anderem an der Inhibierung der Rezeptoren für VEGF und PDGF beteiligt und unterbindet dadurch die intrazelluläre Signalweiterleitung (Abbildung 5).

1.1.6.4.4 Axitinib

Axitinib ist ein seit 2012 von der FDA für die Behandlung von Mamma- und Nierenkarzinom zugelassenes Medikament der Klasse der TKI. Es inhibiert die Rezeptoren für VEGF und PDGF sowie c-Kit (Abbildung 5) (Gunnarsson et al., 2015).

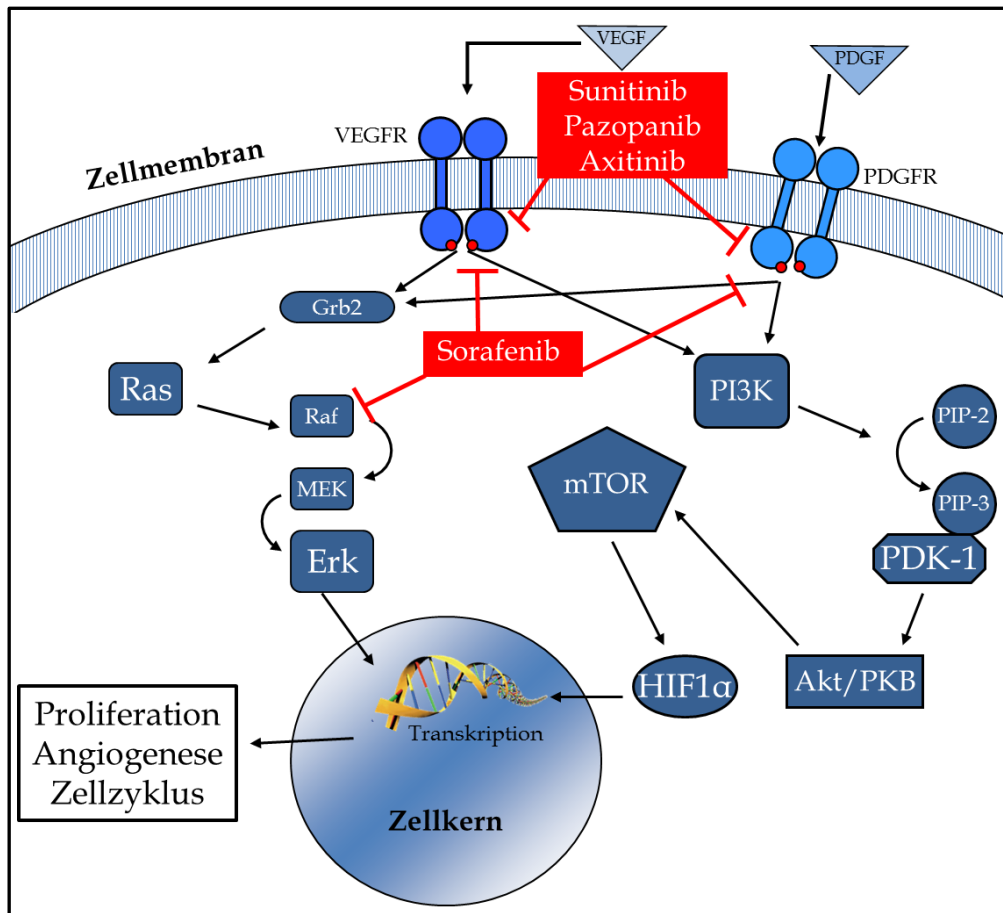


Abbildung 5: Schematische Darstellung des VEGF- und PDGF-Rezeptor-Signalwegs mit Wirkungsstellen der TKI Sorafenib, Sunitinib, Pazopanib und Axitinib. In Anlehnung an (Rini et al., 2009).

1.2 Grundlagen der Metastasierung

Krebserkrankungen treten weltweit auf und sind eine der häufigsten Todesursachen (Jemal et al., 2011). Dabei sterben ca. 90 % aller Patienten an den Folgen einer Metastasierung des Primärtumors (Khan et al., 2010). Die Bildung von Metastasen ist ein *Multistep*-Prozess und lässt sich formal in fünf große Abschnitte aufteilen.

1.2.1 Die Metastasierung - ein *Multistep*-Prozess

Der erste Prozess ist die Dissoziationsphase. In dieser Phase der Metastasierung kommt es in einigen Zellen im Primärtumor zu einer phänotypischen Änderung von Oberflächenmolekülen, die an verschiedenen Vorgängen wie z.B. der Assoziation des Zytoskeletts sowie der Zelladhäsion beteiligt sind (Hood et al., 2002). Die meisten Moleküle, die an der Zell-Zell Adhäsion beteiligt sind, gehören zu den großen Proteinfamilien der Selektine, Cadherine, Integrine und Immunglobuline (Hazan et al., 2004; Niessen et al., 2011; Wang et al., 2009). Damit die Zellen die Adhäsion vom Primärtumor unterbrechen können, muss es zum Verlust von Zell-Zell-Kontakten innerhalb des Tumors kommen. Nachdem sich die Zellen vom Primärtumor dissoziiert haben, kommt es im zweiten Schritt, der Invasion, zur Infiltration des umliegenden Stromas und zur Migration durch die Basalmembran der umliegenden Blut- oder lymphatischen Gefäße (Friedl et al., 2011; Sahai, 2007). Um dies zu gewährleisten werden Proteasen sezerniert, welche die Degradation von Extrazellulär-Matrix (EZM)-Komponenten beschleunigen und somit den Schritt der Invasion erleichtern (Roy et al., 2009). In der Intravasationsphase kommt es zum Eindringen der migrierenden Tumorzellen in die Lymph- oder Blutgefäße. Dieser Prozess ist bis heute nicht genau geklärt; man weiß aber, dass es zu einer Konformationsänderung der Tumorzellen kommen muss, damit diese zwischen den engen Zell-Zell Verbindungen des Endothels hindurchpassen (Wirtz, 2009). Nach Durchwandern der Basalmembran können die Tumorzellen an den gefäßauskleidenden Endothelzellen adhären oder sie wandern frei mit dem Blutstrom in weit entfernte Kompartimente des Körpers (Blood et al., 1990). In der Blutzirkulation sind die Tumorzellen neben dem Immunsystem erheblichen Scherkräften ausgesetzt, sodass etwa nur 1 % aller ausgewanderten Tumorzellen diese Phase überlebt (Fidler et al., 2002; Oppenheimer, 2006; Swartz et al., 2012). Um eine Immunantwort zu umgehen, adhären einige der zirkulierenden Tumorzellen an Thrombo- oder Leukozyten (Blood and Zetter, 1990). In der nächsten Phase der Metastasierung kommt es zur Extravasation, also der Auswanderung von Tumorzellen in geeignete sekundäre Organe (Abbildung 6). Hierfür kommt es zunächst zu einem Zirkulationsstopp durch den die Zellen mit der Adhäsion am Gefäßendothel des

Zielorgans beginnen. Der Zirkulationsstopp kann durch verschiedene Mechanismen eingeleitet werden. Eine erste Theorie besagt, dass die Tumorzellen aufgrund von Auto-Aggregation zu Zellclustern, bzw. Aggregation mit Thrombo- oder Leukozyten, oder durch Proliferation der Tumorzellen im Blutkreislauf nicht mehr durch die kleinen Gefäßkapillaren passen und schlichtweg stecken bleiben (Jeon et al., 2013; Schluter et al., 2006). Von Endothelzellen sezerniertes VEGF kann in diesem Fall zur Verstärkung des Prozesses dienen und die Permeabilität des Endothels erhöhen (Weis et al., 2005). Eine ebenfalls allgemein anerkannte Theorie geht davon aus, dass Tumorzellen in der Lage sind, ähnlich wie bei der Rekrutierung von Leukozyten durch das Immunsystem, an den gefäßauskleidenden Endothelzellen zu „Rollen“. Dieser Vorgang basiert auf der Interaktion verschiedener Oberflächenmoleküle der Selektin- und Integrin-Familie zwischen Tumor- und Endothelzellen. Durch die Bindung an das Endothel wird die Bewegung der zirkulierenden Tumorzellen verlangsamt und es kommt zu einer festen Adhäsion (Gakhar et al., 2013; Geng et al., 2012). Die dritte Theorie wird *Seed and Soil*-Hypothese genannt und besagt, dass Tumorzellen (*Seed*), die aus dem Primärtumor ausgewandert sind und über den Blutkreislauf verteilt werden, nur dort ansiedeln können, wo geeignete Bedingungen (*Soil*) vorliegen (Langley et al., 2011; Psaila et al., 2009; Seyfried et al., 2013). Hierfür müssen die Zellen allerdings aktiv an Strukturen des bevorzugten Milieus adhären, bzw. aufgrund der in Theorie 1 angesprochenen Charakteristika durch einen zu großen Durchmesser des Zellverbands in den Kapillaren stecken bleiben. Die *Seed and Soil*-Theorie wird in dem Abschnitt, der sich mit der Organ-spezifischen Metastasierung befasst, dargestellt werden. Nachdem die Zellen durch das Endothel gewandert sind, verharren sie eine unbestimmte Zeit in dem Zielorgan, welches als Arrest- oder Ruhephase bezeichnet wird. Der Arrest kann durch eine Verschiebung der Balance der Interaktion von pro- und antiangiogenen Faktoren zwischen ausgewandelter Tumorzelle und umgebendem Milieu unterbrochen werden (Almog, 2010). Durch Verschiebung dieser Balance beginnen die ausgewanderten Zellen zu proliferieren und bilden Mikrometastasen aus. Ab einer gewissen Größe sind Mikrometastasen in der Lage unabhängig zu interagieren bzw. umliegende Zellen gezielt zur Sezernierung bestimmter proangiogener Stoffe zu manipulieren (Alizadeh et al.,

2014). Hierbei kommt es unter hypoxischen Bedingungen zur Stabilisierung des HIF- α was wiederum zur Proliferation, Vaskularisierung und Apoptoseresistenz und schließlich zur Bildung von Makrometastasen führen kann (Banumathy et al., 2010; Chou et al., 2013).

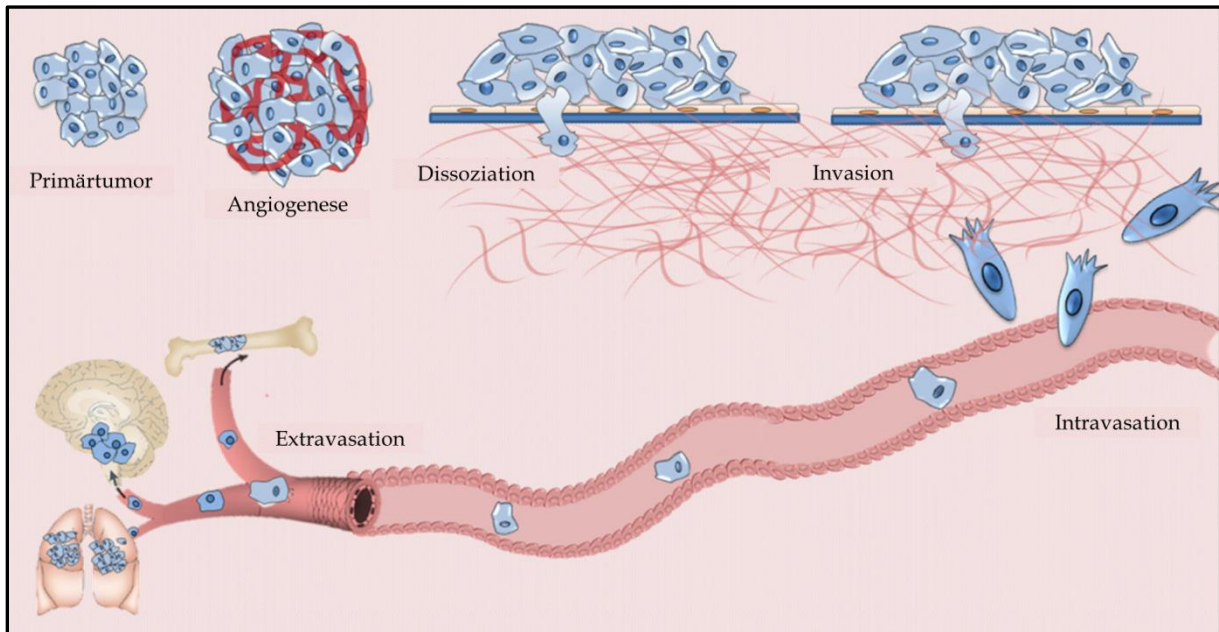


Abbildung 6: Die Metastasierung als *Multistep*-Prozess. Nach der Dissoziation des Primärtumors wandern die Zellen durch das umliegende Stroma und migrieren durch die Basalmembran angrenzender Gefäße. Im Blutkreislauf kommt es zur Verteilung der Zellen und zur anschließenden Extravasation in die Zielorgane. Dort angekommen proliferieren die Zellen entweder zu Mikrometastasen oder verbleiben bis zu mehreren Jahren in einer Art Ruhezustand. Verändert nach (Alizadeh et al., 2014).

1.2.2 Hintergründe der NZK-Metastasierung

Disseminierte Zellen sind trotz ihrer entarteten Form körpereigene Zellen und unterliegen den biologischen Vorgängen des Systems. Sie sind dabei aber stärker als gesunde Zellen auf die Migration, Adhäsion und auch Proliferation angewiesen um sich von einer ausgewanderten Zelle zu einer Makrometastase im Zielorgan zu entwickeln. Auch die Metastasierung beim NZK folgt primär dem im Abschnitt zuvor beschriebenen *Multistep*-Prozess und ist von einer Reihe von intrazellulären Signaltransduktionsprozessen sowie der Interaktion mit benachbarten Zellen via

Oberflächenrezeptoren abhängig. Zwei Arten dieser Oberflächenrezeptoren sind zum einen Rezeptortyrosinkinasen und zum anderen die Integrin-Superfamilie.

1.2.2.1 Rezeptortyrosinkinasen

In die Klasse der Rezeptortyrosinkinasen (RTK) fallen Transmembranproteine, die über eine extrazelluläre Bindungsstelle verfügen und intrazellulär mit einer Tyrosinkinase assoziiert sind. Durch Bindung des passenden Liganden kommt es in den meisten Fällen zu einer Di- bzw. Trimerisierung des Rezeptors und einer folgenden Konformationsänderung, die eine Aktivierung des Rezeptors durch die intrazelluläre Kinase bewirkt. Nach Aktivierung der RTK wird intrazellulär eine Aktivierung meist mehrerer komplexer Signaltransduktionskaskaden initiiert, die eine zelluläre Antwort hervorrufen. Zur Klasse der RTKs zählen unter anderem die Rezeptoren für VEGF, PDGF, EGF und FGF (*Fibroblast growth factor*) (Alberts et al., 2007; Clark, 2009). In entartetem Gewebe kommt es häufig zur Fehlregulation einer oder mehrerer RTKs, die, wie bereits am Beispiel des NZK in Abschnitt 1.1.3 erläutert, zu einer gestörten Expression von Wachstumsfaktoren führen können (Su et al., 2014).

1.2.2.2 Integrine

Die zweite wichtige Klasse der an der Metastasierung beteiligten Oberflächenrezeptoren stellen die Integrine dar. Integrine werden ebenfalls transmembranär exprimiert und sind im gesunden Gewebe für die Bindung mit anderen Zellen sowie der extrazellulären Matrix verantwortlich. Beim Menschen sind derzeit 24 verschiedene Integrin-Heterodimere bekannt, die sich aus je einer α - und einer β -Untereinheit zusammensetzen (Barczyk et al., 2010; Humphries, 2000). In Tumorzellen konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Überexpression von Integrinen einen großen Anteil am Metastasierungspotential trägt. Dutta et al. konnten kürzlich zeigen, dass eine Überexpression des Integrins $\alpha\beta6$ im Prostatakarzinom zu einer verstärkten Osteolyse der Knochen führt (Dutta et al., 2014). In der Arbeit von Schaffner et al. wurde hingegen die Beteiligung des $\alpha5\beta1$ Integrins an einer Vielzahl

von Tumoren verdeutlicht (Schaffner et al., 2013). Die molekularen Hintergründe, die mit einer fehlgeleiteten Rezeptoraktivierung einhergehen, werden im folgenden Abschnitt genauer erläutert.

1.2.2.3 Molekulare Mechanismen der NZK Metastasierung

Nach der Aktivierung der Rezeptoren, die in den Abschnitten 1.2.2.1 und 1.2.2.2 beschrieben wurden, kommt es zur Aktivierung nachgeschalteter Signalwege, die in verschiedene Prozesse des Zellhaushaltes eingreifen können. Durch Aktivierung einer Rezeptortyrosinkinase kann die Phosphatidylinositol 3 (PI3)-Kinase zum zytoplasmatischen Teil des Rezeptors rekrutiert und aktiviert werden. Sie ist nun in der Lage den *Second Messenger* Phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphat (PIP₃) umzusetzen. Durch die erhöhte Akkumulation von PIP₃-Molekülen kommt es zur Rekrutierung und Aktivierung der Proteinkinase B (AKT) (Cully et al., 2006; Holland et al., 2012). AKT übernimmt mehrere Aufgaben. Zum einen wird die mTOR-Aktivität gefördert, was sich in gesteigerter Expression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren ausdrückt. In Tumorzellen kommt es dadurch zu unkontrolliertem Wachstum und Apoptoseresistenz. AKT selbst dient im zweiten Fall als Inhibitor einiger Transkriptionsfaktoren im Zellkern und wirkt sich in malignem Gewebe negativ auf Regulatoren der Apoptose aus. Im dritten Schritt kommt es zur AKT-induzierten Aktivierung der Rho-GTPasen, die für die Umstrukturierung des Zytoskeletts sowie die Ausbildung von Fokalkontakten wichtig sind (Abbildung 7) (Hers et al., 2011).

Bei der Ligandenbindung eines Integrins kommt es zunächst zur Rekrutierung und Aktivierung der intrazellulären Kinasen FAK (*focal adhesion kinase*) und SRC (*Proto-oncogene tyrosine-protein kinase*) mittels Phosphorylierung. Im nächsten Schritt wird eine mehrschrittige MAPK (*Mitogen-activated-proteinkinase*)-Kaskade gestartet, die unter anderem in der Aktivierung von ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*) und JNK (c-Jun NH₂-terminale Kinase) resultieren (Bai et al., 2012; Lechertier et al., 2012). JNK aktiviert den im Zellkern ansässigen Transkriptionsfaktor c-Jun, der zelluläre Prozesse wie die Proliferation und Apoptose fördert (Mitra et al., 2006). Der Integrin-

vermittelte Signalweg kann zusätzlich über eine Aktivierung der RTK weiter stimuliert werden.

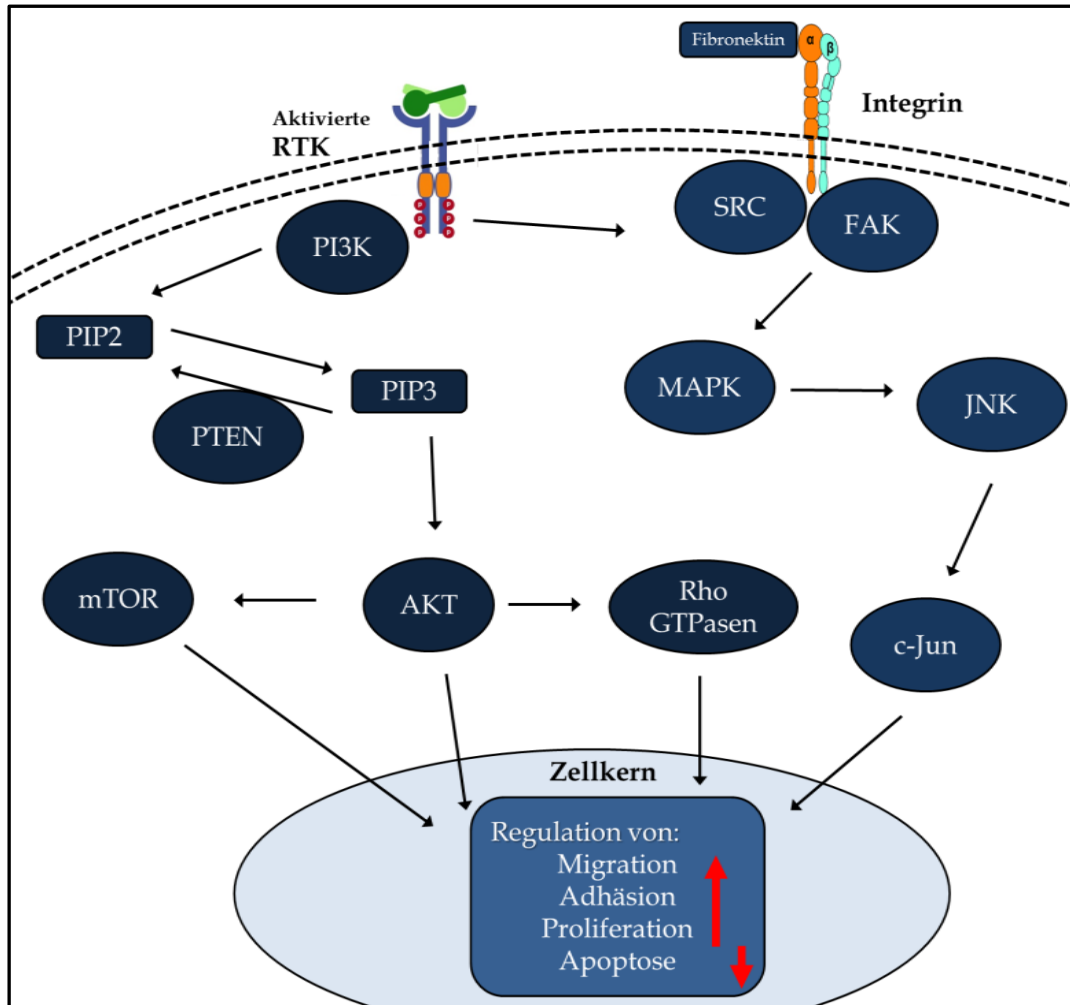


Abbildung 7: Schematische Darstellung der intrazellulären Signalwege, die an der Metastasierung von Tumorzellen beteiligt sind. Über die Aktivierung der Oberflächenrezeptoren kommt es intrazellulär zur Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden, die zelluläre Vorgänge wie die Migration, Adhäsion, Proliferation und Apoptose positiv oder negativ beeinflussen können.

1.2.3 Organspezifische Metastasierung

Wie bereits in Abschnitt 1.2 angedeutet, sind zur Auswanderung einzelner Zellen aus dem Primärtumor und zur anschließenden Metastasierung eine Vielzahl von Schritten nötig. Das Zusammenspiel dieser Faktoren lässt sich bei der Metastasierung sämtlicher Tumorentitäten beobachten. Interessanterweise sind dabei einige Tumorentitäten in der Lage stärker in bestimmte Organe zu metastasieren als andere: Das

Mammakarzinom metastasiert häufig in die Knochen, die Leber und die Lunge, wohingegen das Kolorektal-Karzinom sehr häufig Lebermetastasen ausbildet. Beim Prostata-Karzinom kommt es nur selten zur Streuung in Lunge, Leber oder Gehirn, dafür in ca. 85 % aller Fälle zur Ausbildung von Knochenmetastasen. Hauptmetastasierungsart des NZK ist die Lunge mit über 60 %, gefolgt von Knochen (~35 %), Leber (ca. 20 %) und Hirn (<10 %) (Lu et al., 2007; Mikami et al., 2014) (Abbildung 8).

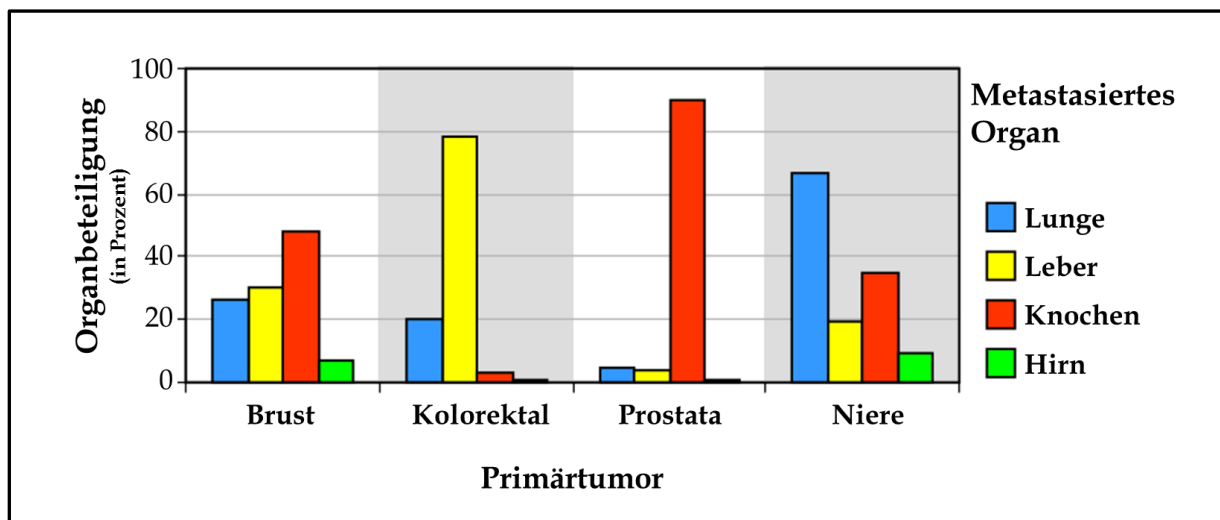


Abbildung 8: Verteilung der Metastasenhäufigkeit bei Brust-, Kolorektal-, Prostata- und Nierenkarzinom mit prozentualer Häufigkeit der Ausbildung von Metastasen der Lunge, Leber, Knochen und dem Hirn. Verändert nach (Lu and Kang, 2007).

Der Grund für die unterschiedlichen Metastasierungsorte verschiedener Tumor-entitäten kann bis heute nicht endgültig erklärt werden, obgleich sich in den letzten Jahren viele Forscher mit dieser Thematik ausführlich befasst und auch teilweise Hypothesen bzw. Lösungsansätze präsentiert haben.

1.2.4 Hypothesen der organspezifischen Metastasierung

1.2.4.1 Die *Seed & Soil*-Hypothese

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts stellte der britische Arzt Stephen Paget bei Untersuchungen von fortgeschrittenen Mammakarzinomen verstorbener Frauen fest, dass die Ausbildung von Metastasen keiner Willkür entsprechen konnte. 1889 formulierte er daraufhin die „*Seed and Soil*“-Hypothese, die besagt, dass einige Tumorzellen (*Seed*) besser in dem Mikromilieu bestimmter Organe (*Soil*) wachsen können als andere und dass Metastasen folglich nur dann auftreten, wenn Tumorzellen auf die passenden Bedingungen im Gewebe des Zielorgans treffen (Langley and Fidler, 2011; Paget, 1889). Mehrfach validiert wurde diese Theorie durch tierexperimentelle Studien, bei denen Mäusen verschiedene Organgewebe implantiert und ein Melanom-Stamm injiziert wurden. Hierbei kam es lediglich zur spezifischen Ausbildung von Metastasen in den Lungen, während andere Organe verschont blieben (Kinsey, 1960; Sugarbaker, 1952).

1.2.4.2 Die *Mechanical Trapping*-Theorie

Im Jahr 1928 postulierte der amerikanische Pathologe James Ewing, dass disseminierte Tumorzellen im Blutfluss aufgrund anatomischer Größenunterschiede bereits im ersten Kapillarbett „gefangen“ werden und in dem angrenzenden Organ Mikro- bzw. Makrometastasen ausbilden (Irmisch et al., 2013). Beim Kolorektal-Karzinom kommt es häufig zur Ausbildung von Metastasen in der Leber, die mit dem Dickdarm über die *Vena mesenterica superior*, die in die Pfortader der Leber mündet, verbunden ist. Bisher konnte durch Experimente gezeigt werden, dass abhängig von der Tumorentität sowohl die eine, als auch die andere bzw. eine Kombination beider Hypothesen vorliegen kann (Valastyan et al., 2011). Beispiele hierfür sind die feinen Kapillarstrukturen von Leber und Knochenmark, die es, durch einen hohen Grad der Fenestrierung, disseminierten Tumorzellen erleichtern, hindurchzuwandern (Nguyen et al., 2009).

1.2.4.3 Die knochenspezifische Metastasierung

Das Knochengewebe liegt in ständigem Gleichgewicht zwischen Aufbau durch Osteoblasten und Abbau durch Osteoklasten. Wird diese Homöostase gestört, kann das verheerende Folgen für den Körper haben. Bei etwa 30 % aller Patienten mit fortgeschrittenem NZK treten Metastasen in den Knochen auf (Mikami et al., 2014). Knochenmetastasen lassen sich formell in knochenaufbauende (osteoblastische) und knochenabbauende (osteolytische) Metastasen aufteilen, wobei die osteolytischen mit knapp $\frac{3}{4}$ am häufigsten auftreten (van Driel et al., 2014). Rein strukturell betrachtet bietet das Knochengewebe mit seiner feinen Fenestrierung ideale Bedingungen für die Infiltration der disseminierten Tumorzellen aus der Niere (Nguyen et al., 2009). Außerdem kommt es durch die ständige Umstrukturierung der Knochenmatrix zur Freisetzung der Wachstumsfaktoren TGF- β (*Transforming growth factor beta*), IGF I und II (*Insulin-like growth factor*), PDGF und FGF, die die Migration der Tumorzellen steuern und die Adhäsion an der Knochenmatrix erleichtern (Roodman, 2004; van Driel and van Leeuwen, 2014). Die Arbeitsgruppe um Satcher et al. konnte erst kürzlich zeigen, dass Cadherin-11, ein Protein der Zell-Adhäsion, großen Anteil an der Migration und somit knochenspezifischen Metastasierung des NZK hat (Satcher et al., 2014).

1.2.5 Der Calcium-sensitive Rezeptor

Bereits seit über einem Jahrhundert wusste man über die Wichtigkeit von Calcium-Ionen für physiologische Wechselwirkungen, wie z.B. die Aufrechterhaltung der systemischen Calcium-Homöostase innerhalb des Körpers. Doch erst 1993 gelang der Forschergruppe um Brown et al. mit der Entdeckung und der ersten Klonierung der Nachweis, dass der Calcium-sensitive Rezeptor (CaSR) für die Regulation extrazellulärer Calcium-Ionen zuständig ist. Bei dem CaSR handelt es sich um ein Oberflächenprotein der G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Superfamilie (GPCR – *G-Protein-coupled receptor*). Das Gen des CaSR liegt auf dem Chromosom 3q²¹ und codiert für ein Protein von 1078 Aminosäuren Länge (Brown et al., 1993; Hendy et al., 2013). Typisch für alle Mitglieder der GPCR-Familie sind drei Struktureigenschaften: Eine

extrazelluläre N-terminale Domäne, eine 7- α -Helices umfassende Transmembran-domäne und eine intrazelluläre, C-terminale Domäne (Abbildung 9).

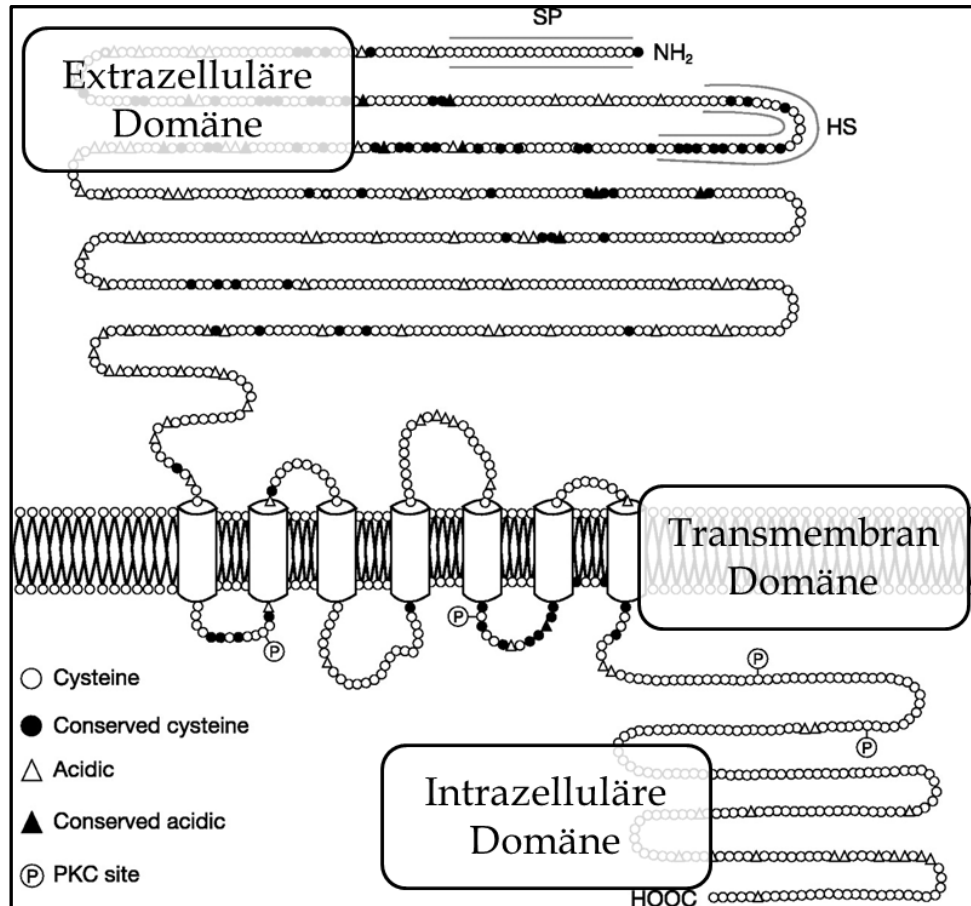


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Calcium-sensitiven Rezeptors mit extrazellulärer N-terminaler Domäne, sieben transmembranen α -Helices und intrazellulärer C-terminaler Domäne. P = Phosphatrest, SP = Signalpeptid, HS = hydrophobes Segment (Rodriguez et al., 2005).

1.2.5.1 Der Aufbau des CaSR

1.2.5.1.1 Die extrazelluläre Domäne

Wie bei allen Mitgliedern der GPCR-Superfamilie beinhaltet der CaSR eine sehr lange extrazelluläre Domäne, die aus 612 Aminosäuren besteht und durch ein *Venus-Flytrap* (VTP)-Motiv und eine cysteinreiche Region charakterisiert ist (Brown et al., 1993; Hu et al., 2007). Die extrazelluläre Domäne stellt den mit Abstand wichtigsten Teil des CaSR dar, da dort neben Liganden-Bindungsstelle und N-Glykosylierungsstelle, die überaus wichtig für die biologische Funktion des Rezeptors ist, die meisten

Aktivitäts-beeinträchtigenden Mutationen nachgewiesen wurden (Fan et al., 1997; Hu and Spiegel, 2007; Ray et al., 1998; Reyes-Cruz et al., 2001).

1.2.5.1.2 Die Transmembrandomäne

Die Transmembrandomäne des CaSR besteht insgesamt aus 249 Aminosäuren, die sich zu sieben hydrophoben α -Helices formen. Die Helices sind intra- bzw. extrazellulär alternierend miteinander verbunden (Hu and Spiegel, 2007). Die Transmembran-Domäne ist sowohl an der Aktivierung des G-Proteins als auch an der Signaltransduktion beteiligt und steht in Verdacht, an der Dimerisierung des Rezeptors beteiligt zu sein (Zhang et al., 2001; Zhao et al., 1999).

1.2.5.1.3 Die intrazelluläre Domäne

Die intrazelluläre Domäne besteht aus 216 Aminosäuren und ist sowohl an der extrazellulären Expression als auch an der intrazellulären Signalweiterleitung akzessorischer Proteine beteiligt (Hjalm et al., 2001; Ray et al., 1997). Dies beinhaltet die N- Binde- bzw. Substratstellen, sowohl für die Proteinkinase C (PKC - Thr888, Ser895, und Ser 915) als auch für die Proteinkinase A (PKA - Ser899 und Ser900), die nach Aktivierung der Zelle via CaSR wichtige Aufgaben, wie Proliferation und Migration, einleiten können (Bai et al., 1998; Bosel et al., 2003).

1.2.5.2 Regulatoren des CaSR

Obwohl Calcium, wie der Name schon sagt, der Hauptbindungspartner des CaSR ist, kann der Rezeptor eine Vielzahl von Liganden erkennen und binden und dadurch aktiviert werden (Riccardi, 2002). Grundsätzlich wird dabei zwischen orthosterischen Modulatoren sowie endogenen und synthetischen, allosterischen Modulatoren unterschieden.

1.2.5.2.1 Orthosterische Modulatoren des CaSR

Unter die Gruppe der orthosterischen Modulatoren fallen neben dem Calcium zum einen di- und trivalente Kationen, wie z.B. Magnesium (Mg^{2+}), Beryllium (Be^{2+}), Strontium (Sr^{2+}), Gadolinium (Gd^{3+}), Barium (Ba^{2+}) und Lanthan (La^{3+}), aber auch aminoglykosidische Antibiotika, beta-Amyloid-Peptide und Polyamine wie Putrescin (Riccardi, 2002). Orthosterische Modulatoren binden wie Calcium an der orthosterischen Bindungsstelle innerhalb des *Venus Flytrap Motifs* der extrazellulären Domäne des CaSR (Cavanaugh et al., 2012; Jensen et al., 2007).

1.2.5.2.2 Allosterische Modulatoren

Allosterische Modulatoren sind in der Lage an der Transmembrandomäne des CaSR zu binden und führen zu leichten Konformationsänderungen in der dreidimensionalen Struktur des Moleküls. Daraus resultiert in manchen Fällen eine Modulation der Rezeptoraffinität bzw. Alteration in der Liganden-Bindungsstärke. Unter die Kategorie der endogenen allosterischen Modulatoren fallen die L-Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin, L-Histidin und L-Tryptophan. Synthetische allosterische Modulatoren werden durch *Calcimimetics* und *Calcilytics* wie z.B. NPS2143 vertreten (Jensen and Brauner-Osborne, 2007; Nemeth et al., 2001).

1.2.5.3 Die physiologischen Aufgaben des CaSR

Die Hauptaufgabe des CaSR ist die Regulation der systemischen Calcium-Homöostase, also die Balance zwischen absorbierten und sezernierten Calcium-Ionen aufrecht zu erhalten (Brown, 2000; Kallay, 2013). Der CaSR wird dabei in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, unter anderem in den Epithelzellen der Nebenschilddrüse, entlang des gesamten Nephrons der Niere, den Hauptorganen des Gastrointestinal-Traktes (Ösophagus, Magen, Dickdarm), in den Knochen, in der Brust, im Herz und sogar in Teilen des Nervensystems (Riccardi et al., 1998). Der von Brown et al. 1993 erstmals durchgeführte Klonierungsversuch des CaSR wurde an Epithelzellen der Nebenschilddrüse durchgeführt (Brown et al., 1993). In der

Schilddrüse ist der Rezeptor an der Regulation vieler intrazellulärer Signalwege beteiligt, wie z.B. dem MAP-Kinase (MAPK)- und dem Phospholipase C (PLC)-Signalweg. Dabei reagiert die Zelle auf einen Abfall der extrazellulären Calcium-Konzentration durch die verminderte CaSR-Aktivität mit der Produktion von Parathormon (PTH) in den Nebenschilddrüsen und einer Senkung der Calcitonin-Sekretion aus den C-Zellen der Schilddrüse (Houillier et al., 2003; Tharmalingam et al., 2011; Toka, 2014). Die erhöhte PTH-Konzentration führt zu einer gesteigerten Knochenresorption, was wiederum zu einer erhöhten Freisetzung von Calcium-Ionen führt. Die Nieren sind weitere Organe, die eine wichtige Rolle in der Calcium-Homöostase spielen. In den Nieren kommen dem CaSR je nach Kompartiment unterschiedliche Aufgaben zu. Im Sammelrohr dient der Rezeptor der Wasserresorption durch die Regulation der Aktivität von Aquaporin-2, wohingegen er im proximalen Tubulus an der Regulation des Phosphat-Haushaltes in Kombination mit PTH beteiligt ist (Ba et al., 2004; Bustamante et al., 2008). Kommt es zu einer Erhöhung der PTH-Konzentration durch die Nebenschilddrüse reagieren die Nieren mit einer erhöhten Produktion von 1,25 Dihydroxyvitamin D₃, was wiederum die Calcium-Aufnahme aus dem Gastrointestinal-Trakt ankurbelt (Quarles, 2003).

1.2.6 Die Rolle des CaSR in der Knochenmetastasierung

Calcium ist eines der häufigsten Mineralien im menschlichen Körper und nimmt in etwa die Masse von einem Kilogramm ein. Davon sind etwa 99 % in den Knochen als Calciumphosphat gespeichert (Marshall et al., 2005). Der Calcium-Anteil der Knochen übertrifft demnach bei weitem den Anteil an Calcium anderer Organe und könnte damit einen Erklärungspunkt für die knochenspezifische Metastasierung liefern. Neben den physiologischen Aufgaben des CaSR in vielen Kompartimenten und Organen des Körpers spielt der CaSR für die knochenspezifische Metastasierung anderer Tumorentitäten eine wichtige Rolle. Im Jahr 2006 untersuchte die Arbeitsgruppe um Liao et al. die Rolle des CaSR bei der Metastasierung des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms in die Knochen. Hierbei konnten sie bei zwei knochenmetastasierenden Zelllinien zeigen, dass eine erhöhte Calcium Konzen-

tration zu einer stärkeren Proliferation der Zellen führte, als bei Prostatakarzinom-Zellen, die nicht in die Knochen metastasieren (Liao et al., 2006; Saidak et al., 2009). 2009 gelang der Forschergruppe um Saidak et al. der Nachweis, dass Calcium-Ionen, die durch den CaSR wahrgenommen wurden, die Proliferation knochenmetastasierender Brustkrebs-Zellen deutlich steigern konnten (Saidak et al., 2009). Aber auch für die knochenspezifische Metastasierung des NZK konnten in unserem Labor (AG Brenner) im Jahr 2014 deutliche Fortschritte erzielt werden. Hierbei wurde festgestellt, dass eine erhöhte Calcium-Konzentration einen positiven Einfluss auf die Proliferation und Migration von primären NZK-Zellen und Zellkulturen hat (Jöckel et al., 2014). Die daran beteiligten Signaltransduktionswege werden im Abschnitt 3.2.4 dargestellt.

1.2.6.1 Der *Circulus Vitiosus* der Knochenmetastasierung

Durch ständigen Auf- und Abbau der Knochensubstanz wird neben Calcium eine große Bandbreite an Wachstumsfaktoren umgesetzt, die wiederum stark auf metastasierende Zellen Einfluss nehmen können. Zu Beginn der Metastasierung wandern die disseminierten Zellen aus dem Primärtumor aus und gelangen über den Blutkreislauf in den Knochen. Hier adhären sie zunächst an der Knochenmatrix und kommunizieren mit dem sie umgebenden Milieu. Durch die Tumorzellen selbst wird ein Teufelskreis (*Circulus Vitiosus*) in Gang gebracht, der das Wachstum des Tumors weiter vorantreibt und die Zerstörung der Knochen begünstigt (Kozlow et al., 2005; Yoneda et al., 2005). Der Abbau der Knochen durch Osteoklasten setzt neben Calcium vor allem die Wachstumsfaktoren TGF- β , FGF, PDGF und IGF frei (Mohan et al., 1991). Diese Faktoren sind neben der direkten Stimulation der Tumorproliferation in der Lage die Angiogenese zu fördern und die Produktion von Osteoklasten- und Osteoblasten-stimulierenden Faktoren anzukurbeln. Zu den osteolytischen Faktoren zählt TGF- β , welches die Knochenmetastasierung begünstigt, indem es die pro-osteolytische Genexpression durch das *parathyroid hormone-related protein* (PTHrP) stimuliert. Durch die Stimulierung von PTHrP kommt es zur Produktion des Liganden für den *receptor activator for nuclear factor κ B*

(NF κ B-RANKL), der auf der Oberfläche von Osteoklasten durch den passenden Rezeptor RANK erkannt wird (Kitazawa et al., 2002; Kondo et al., 2002). Die Bindung zwischen RANK und RANKL führt zur Reifung und gesteigerten Aktivität der Osteoklasten und treibt die Metastasierung durch Umsetzung weiterer Wachstumsfaktoren voran. PTHrP wird sowohl von Mamma- als auch Prostatakarzinomen exprimiert und nutzt den gleichen Rezeptor wie PTH. An dieser Stelle kommt dem CaSR eine wichtige Rolle zu. In gesundem Gewebe führt die Aktivierung des CaSR durch Calcium zu einer Inhibierung der PTHrP-Freisetzung, wohingegen in malignen Geweben, wie bei Prostata- oder Mammakarzinomen, eine Aktivierung des CaSR in erhöhter PTHrP-Freisetzung resultiert (Vanhouten et al., 2013). Osteoblasten-stimulierende Faktoren wie VEGF, PDGF und ET-1 (Endothelin-1) sind nach der Sezernierung durch Tumorzellen in der Lage, die Differenzierung und Reifung der Osteoblasten weiter zu begünstigen (Abbildung 10) (Kingsley et al., 2007).

Von der Knochenmatrix freigesetztes Calcium hat ebenfalls eine tragende Rolle im *Circulus Vitosus*. Im gesunden Knochen beträgt die Konzentration an Calcium-Ionen etwa 1,1 - 1,3 mmol/L. Die Knochenresorption durch Osteoklasten kann die Konzentration aber auf bis zu 40 mmol/L ansteigen lassen, was in einer deutlichen Erhöhung der CaSR-Aktivität resultiert (Berger et al., 2001). Durch die Aktivität des CaSR kommt es wiederum zu einer erhöhten PTHrP-Freisetzung, die den Teufelskreis von neuem beginnen lässt.

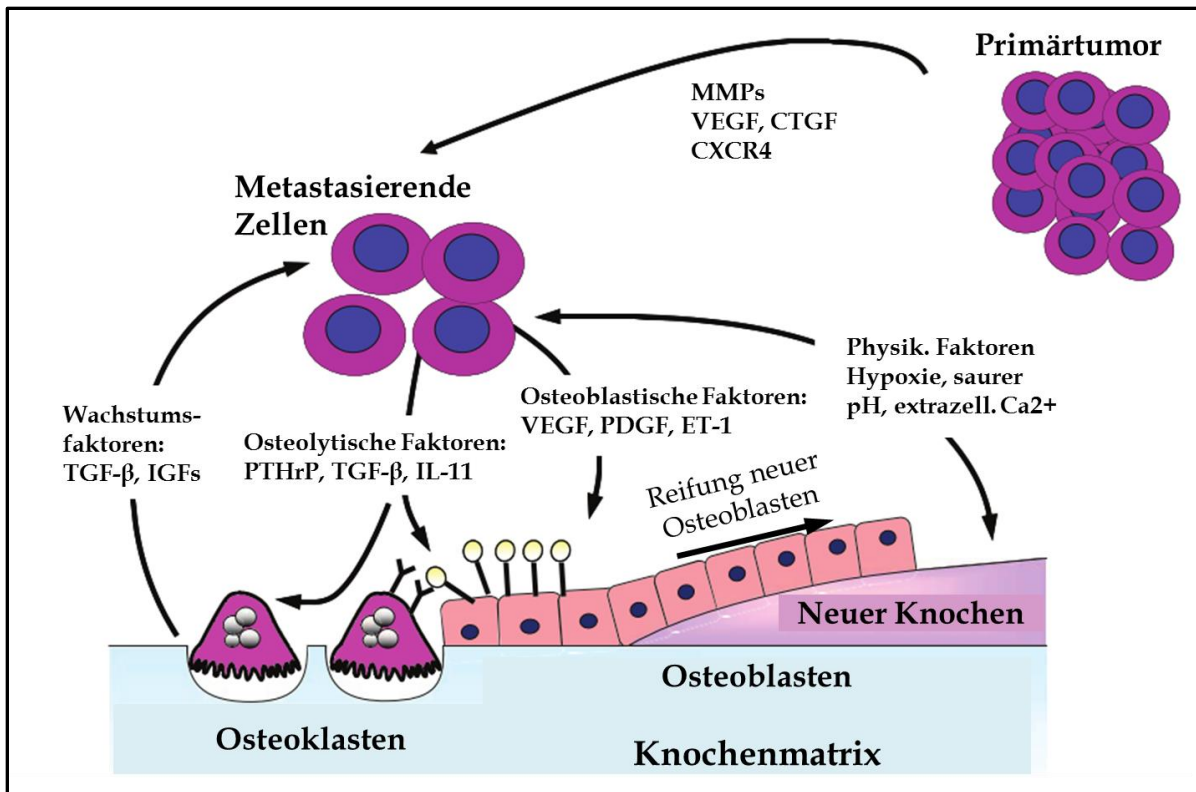


Abbildung 10: Schematische Darstellung des *Circulus Vitiosus*. Faktoren wie MMPs, VEGF, CTGF und CXCR4 sind in der Lage, die Tumorzellen zum Knochen zu lotsen. Physikalische Faktoren im Knochenmilieu wie Hypoxie, saurer pH oder extrazelluläre Ca^{2+} -Ionen und Wachstumsfaktoren aus dem Knochen wie TGF- β und IGF aktivieren die Expression von Osteoblasten-stimulierenden Faktoren wie VEGF, PDGF und ET-1. Osteolytische Faktoren (PTHrP, TGF-beta und IL-11) stimulieren Knochenzellen, weitere Faktoren zu sezernieren, die das Tumorwachstum in den Knochen weiter fördern. Verändert nach (Kingsley et al., 2007).

1.2.6.2 CaSR-regulierte Signalwege

Der CaSR ist mit einer Vielzahl intrazellulärer Signalwege assoziiert, die je nach aktiviertem Signalweg Einfluss auf die Migration, Proliferation, Ionen-Kanal-Aktivität und Differenzierung, aber auch Genexpression und Apoptose der Zelle haben können (Brown et al., 2001; El Hiani et al., 2009). Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass jeder der nachfolgenden Signalwege bei einer Fehlregulation oder Mutation zur Förderung des Tumorwachstums bzw. zur Metastasenbildung führt. Dabei beginnt jeder mögliche Signalweg zunächst mit der Bindung eines geeigneten Liganden an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors. Dies führt zu einer Konformationsänderung des an den Rezeptor gekoppelten heterotrimeren G-Proteins durch den Austausch von GDP (Guanosindiphosphat) gegen GTP (Guanosintriphosphat). Dabei assoziiert der Rezeptor mit der α -Untereinheit des hetero-

trimeren Komplexes, führt eine Konformationsänderung durch und das GDP dissoziiert vom Rezeptor. Die Bindestelle ist nun frei und wird rasch mit GTP besetzt. Dabei dissoziiert die β -Untereinheit des G-Proteins und durch die Bindung der α -Untereinheit werden verschiedene Signaltransduktionsprozesse gestartet (Krauss, 2003). Über die Aktivierung des PLC-Signalwegs produziert Diacylglycerol (DAG), ein *Second Messenger*, der über die hydrolytische Spaltung von PIP₂ durch PLC entstanden ist, wiederum IP₃. IP₃ fördert die Freisetzung von intrazellulären Calcium-Ionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER). Das dabei einströmende Calcium ist in der Lage Calmodulin zu aktivieren, welches wiederum in der Aktivierung der Phospholipase A₂ resultiert (Kifor et al., 1997). Die Kombination aus DAG und einströmenden Calcium-Ionen ist somit in der Lage die Proteinkinase C (PKC) zu aktivieren, die als mögliche Initialzündung verschiedener Signalwege in Frage kommt. Durch den MAP-Kinase-Signalweg (ERK, JNK und p38 α) und weitere Signalwege *downstream* kommt es im Zellkern zur Synthese von pro-proliferativen Transkriptionsfaktoren (Ogata et al., 2006). Über die Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)/AKT-Signalwegs und der anschließenden Aktivierung des mTOR-Signalwegs ist der CaSR ebenfalls an der Regulation der Apoptose beteiligt (Li et al., 2012; Marie, 2012). Ein weiterer Signalweg, der über die PI3K/AKT-Signalkaskade eingeleitet wird, ist der Rho-GTPase Signalweg, der in der Zelle zu einer gesteigerten Adhäsion und durch die Umstrukturierung des Zytoskeletts ebenfalls zu einer gesteigerten Migration führen kann (Abbildung 11) (Tharmalingam et al., 2011; Tu et al., 2011).

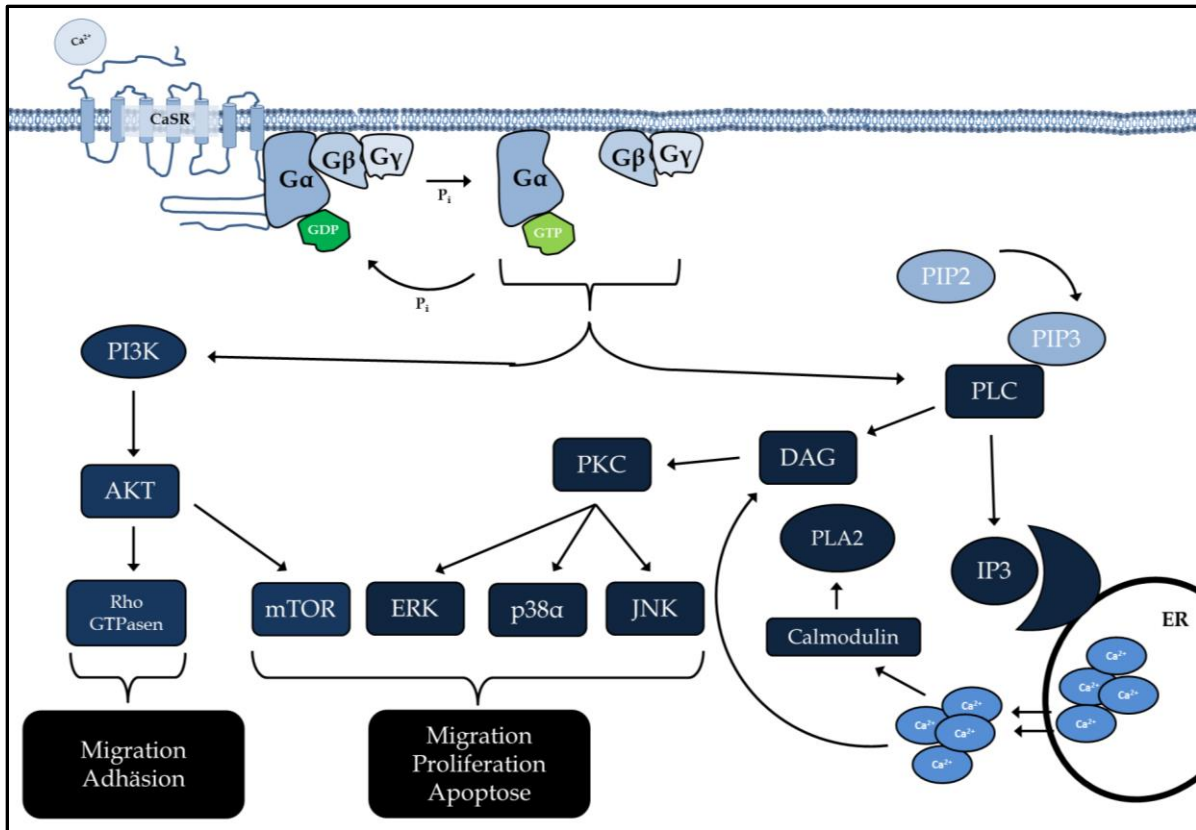


Abbildung 11: Schematische Darstellung der intrazellulären Signalwege, die durch den CaSR aktiviert werden. Durch die Calcium-getriggerte Aktivierung des CaSR werden Signalwege gestartet, die in zelluläre Prozesse wie Migration und Proliferation, aber auch Apoptose eingreifen. Verändert nach (Magno et al., 2011).

1.3 Zielsetzung

Patienten mit fortgeschrittenem NZK sind in etwa 30 % der Fälle im Verlauf der Erkrankung von Knochenmetastasen betroffen, was darauf hindeutet, dass der Ort der Metastasierung keiner Willkür unterliegen kann. Da andere Tumorentitäten ebenfalls bevorzugt in die Knochen metastasieren, liegt die Vermutung nahe, dass die Knochen ein wachstumsförderndes Milieu für Tumorzellen darstellen. Für Prostata- und Mammakarzinom liegen bereits umfassende Arbeiten vor, die von der Metastasierung der Knochen handeln, wohingegen der Grund der knochen-spezifischen Metastasierung beim NZK weitestgehend unerforscht ist. In vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe konnte bereits ein Beitrag diesbezüglich geleistet und der CaSR im Zusammenspiel mit dessen Liganden Calcium als potentieller Biomarker einer knochenspezifischen Metastasierung identifiziert werden. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der weiteren Aufklärung der

Mechanismen, die, ausgehend von einer Überexpression des CaSR, an einer knochenspezifischen Metastasierung beteiligt sind, bzw. diese fördern oder inhibieren. Zu diesem Zweck sollten zunächst CaSR-negative NZK-Zellen mit einem Klon des CaSR stabil transfiziert werden, um in anschließenden funktionellen Experimenten das Migrations-, Adhäsions-, Vitalitäts- und Proliferationsverhalten der Zellen nach Calciumstimulation zu untersuchen. Des Weiteren sollten Western Blot-Analysen Aufschluss darüber geben, welche intrazellulären Signalmediatoren an der CaSR-vermittelten Proliferation, Adhäsion, Migration und Vitalität beteiligt sind.

Sollte sich der CaSR in den weiteren Analysen als potentieller Verursacher der knochenspezifischen Metastasierung des NZK bewahrheiten, so könnten in Zukunft Expressionsraten des CaSR aus Primärtumoren eine mögliche Knochenmetastasierung vorhersagen und somit präventive Schritte in der Behandlung der Patienten zulassen.

2 Material und Methoden

2.1 Material und Reagenzien

2.1.1 Chemikalienliste

kb *DNA Ladder* (Invitrogen, Darmstadt / NEB Biolabs, USA); 100 bp *DNA Ladder* (NEB Biolabs, USA); Aceton (Applichem, Darmstadt); Agarose (Starlab, Ahrensburg); Albumin, *from bovine serum* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); Ammoniumperoxidsulfat (APS) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe); Amniomax C100 Basal Medium (Gibco, Life Technologies); Amniomax C100 *Supplement* (Gibco, Life Technologies); Ampicillin (Ratiopharm, Ulm); *Antarctic Phosphatase Reaction Buffer* (10x) (New England Biolabs, Ipswich, USA), Aqua dest. (Braun, Melsungen); Bacto-Agar (Becton, Le Pont de Croix); Bacto-Trypton (Becton, Le Pont De Croix); Bacto-Yeast-Extrakt (Becton, Le Pont De Croix); Bench Mark *Prestained Protein Ladder* (Invitrogen); BigDye Sequenzierungsmix (Genterprise, Mainz); BioRad Sammelgel- und Trenngelpuffer (BioRad, USA); Bromphenolblau (Sigma Chemie, Deisenhofen); Calciumchlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim); Collagenase II (Invitrogen, Darmstadt); Dithiotreithol (DTT) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe); Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, Steinheim); *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* 1x (DPBS) (Gibco, Life Technologies); Essigsäure konz. (Carl Roth GmbH, Karlsruhe); Ethanol abs. (Applichem, Darmstadt); Fötale Kälberserum frei von Doxycyclin (FCS) (Gibco, Life Technologies); HEPES (Gibco, Life Technologies); Isopropanol (Merck, Darmstadt); Kaliumacetat (Gerbu, Galberg); Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt); Light Cycler 480 SYBR Green I Master (Roche, Mannheim); Magermilchpulver (Applichem, Darmstadt); Magic Mark XP Western Protein Standard (Invitrogen); β -Mercaptoethanol (Sigma Chemie, Deisenhofen); 2-Methylbutan (Carl Roth GmbH); Natronlauge 1M (Applichem, Darmstadt); Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe); OrangeG (Sigma Aldrich, Steinheim); Penicillin/Streptomycin (Anti-Anti) (Gibco, Life Technologies); Phosphatase-Inhibitor (Sigma, Steinheim); Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Boehringer, Mannheim); Phosphatase-Inhibitor (Sigma-Aldrich, Steinheim); PI/RNase *Staining Buffer* (BD Biosciences, San Diego, USA); Protease-Inhibitor (Sigma, Steinheim); Roti-Block (Carl Roth GmbH, Karlsruhe); Roti

Blot A und K (Carl Roth GmbH, Karlsruhe); Roti Blue 5x (Coomassie-Färbung) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe); Rotiphorese 10x SDS PAGE (Carl Roth GmbH, Karlsruhe); Rotiphorese Gel 30 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe); TEMED - Tetramethylethylen-diamin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe); Trypsin EDTA (Gibco, Life Technologies); Tween20 (Applichem, Darmstadt); *Western Lightning Plus-ECL Enhanced Luminol Reagent Plus* (Perkin Elmer Life Sciences, Waltham, USA).

2.1.2 Puffer und Lösungen

Agarose (1 %)	1 g Agarose ad 100 ml TBE
Anodenpuffer	16 ml Roti Blot A 32 ml Ethanol abs. 84 ml Aqua dest.
Biorad Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl Puffer pH 6,8
Biorad Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl Puffer pH 8,8
Blockpuffer (für 1 Membran)	20 ml TBS (1 x) 0,1 % Tween 20 5 % Magermilchpulver
Coomassie-Färbelösung	60 ml H ₂ O 20 ml Methanol 20 ml Roti Blue (5x) unter Rühren hinzugeben
Elektrophoresepuffer	Rotiphorese 10x SDS PAGE (100 ml) Aqua dest. (900 ml)
Entfärbelösung für Coomassie	2,5 ml Ethanol abs. 7,5 ml Essigsäure konz. Ad 100 ml H ₂ O

Material und Methoden

Ethidiumbromid-Färbelösung	5 µg EtBr/ml Aqua dest.
Kathodenpuffer	16 ml Roti Blot K 32 ml Ethanol abs. 84 ml Aqua dest.
Ladepuffer (6x)	350 mM Tris-HCl-Puffer pH 6,8 34,4 % Glycerol 10 % SDS 10 % β-Mercaptoethanol 0,06 % Bromphenolblau
LB-Agar (Agarplatten)	15 g Bacto-Agar Ad 1000 ml LB-Medium
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Yeast-Extract 10 g NaCl Ad. 1000 ml Aqua dest.
Lysepuffer	500 µl 10x Puffer für Zellyse 50 µl DTT (0,5 mM) 50 µl Phosphatase-Inhibitor 50 µl Protease-Inhibitor 100 µl PMSF (2 mM) 4250 µl Aqua dest.
OrangeDye	15 g Sucrose 0,175 g OrangeG Ad. 50 ml Aqua dest.
Paraformaldehyd (4 %) 100 ml	4g Paraformaldehyd ad 80 ml DPBS erhitzen Lösen in 2M NaOH abkühlen Mit 6M HCl auf pH 7,2 einstellen

Material und Methoden

Puffer für Zellyse

20 mM HEPES
0,2 M NaCl
1,5 mM MgCl₂ x 6 H₂O
0,4 mM EDTA
1% Triton X-100

Puffer nach Weise

1 Puffertablette nach Weise
Ad 1000 ml Aqua dest. (pH 6,8)

Sammelgel (3 %) Western Blot (1 Gel)

2,1 ml Aqua dest.
0,5 ml Acrylamid (30 %)
0,38 ml Sammelgelpuffer
30 µl SDS (10 %)
30 µl APS (10 %)
3 µl TEMED

SOB-Medium

20 g Bacto-Tryptone
5 g Bacto-Yeast-Extract
0,5 g NaCl
10 ml MgCl₂ (1 M)
10 ml MgSO₄ (1 M)
Ad 1000 ml Aqua dest.

SOC-Medium

1 ml Glucose-Lösung (2 M)
Ad 100 ml SOB-Medium

TBE-Puffer (10 x)

890 mM Tris
890 mM Borsäure
25 mM Na₂EDTA

Tfb1-Puffer

30 mM KAc
50 mM MnCl₂
100 mM KCl
10 mM CaCl₂
15 % Glycerin; auf pH 5,8 einstellen

Tfb2-Puffer	10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ 10 mM KCl 15 % Glycerin
Trenngel (10 %) Western Blot (1 Gel)	1,9 ml Aqua dest 1,7 ml Acrylamid (30 %) 1,3 ml Trenngelpuffer 50 µl SDS (10 %) 50 µl APS (10 %) 2 µl TEMED
Trenngel (7,5 %) Western Blot (1 Gel)	2,65 ml Aqua dest 1,25 ml Acrylamid (30 %) 1,3 ml Trenngelpuffer 50 µl SDS (10 %) 50 µl APS (10 %) 2 µl TEMED
Waschpuffer (Western Blot)	Aqua dest 1 % TBS (24,2 g Tris-HCl, 80 g NaCl, ad 1 l Aqua dest.) 0,1 % Tween 20

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Alkopharm 70 (Nedalgo, Heilbronn); Chromatographie Filterpapier (Whatman, England); Eppendorf- *Safe-Lock* Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml) (Eppendorf, Hamburg); Glas Pasteurpipetten (Carl Roth GmbH, Darmstadt); Einweghandschuhe (Nitril) (Microflex, Österreich); Einwegskalpelle steril (Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan); Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml) (Greiner BioOne, Frickenhausen); *Tissue Culture Plate 6-/96-well* (Greiner BioOne, Frickenhausen); Pipettenspitzen (0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 101-1000 µl); Polypropylen (PP-)-Röhrchen (15 ml und 50 ml) (Greiner BioOne, Frickenhausen);

Polystyrol (PS)-Rundbodenröhrchen (5 ml) (BD Biosciences, Bedford, USA); Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Millipore, England); Zellkulturflaschen 25 cm², 75 cm², 175 cm² (Greiner BioOne, Frickenhausen); Zellkulturschalen 72 cm² und 165 cm² (Greiner BioOne, Frickenhausen); Zellschaber (Nunc, Roskilde).

2.1.4 Gebrauchsmaterialien

Nalgene *Cryo Freezing Container* (Nalgene Nunc International, Roskilde, DK); Neubauer Zählkammer (Merck, Darmstadt); Pinzette (Labotec, Wiesbaden); Pipetten Research Eppendorf (0,5-10 µl, 1-100 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl) (Eppendorf, Hamburg); Pipettierhilfe *Accu-Jet Pro* (Brand, Wertheim).

2.1.5 Geräte

Absaughilfe *Vacuboy* (IBS Integra Biosciences, Fernwald); Agarose-Gelkammern (Peqlab, Erlangen) (Renner, Darmstadt); Blotting-Apparatur *Trans Blot Turbo* (BioRad, USA); CO₂-Inkubator Hera Cell 240 (Heraeus, Hanau); Computer (Dell, USA); Durchflusszytometer (FACS - *Fluorescence Activated Cell Sorter*) FACSCalibur (BD Biosciences, Bedford, USA); ELISA Reader Anthos 2010 (Anthos, Krefeld); Gefrierschrank -20°C (Bosch, Gerlingen); Gefrierschrank -80°C (Nalgene Nunc Int., Penfield, USA); Gel-Elektrophoresekammer Mini Protean Tetra System (BioRad, USA); Heiz-/Magnetrührer (IKA Labortechnik, Stauffen); Heizblock Eppendorf-Thermomixer *compact* (Eppendorf, Hamburg); Inkubationsschüttler VSR 23 (Grant Boekel, Cambridge, England); Kryo-Stickstofftank *Locator 6 Plus* (Thermo Scientific Thermoline, Langenselbold); Kühlschranks 4°C Cooler (Bosch, Gerlingen); Labor-Feinwaage (Sartorius, Göttingen); MAC (Apple, USA); Magnet-Heizrührer IKAMAG RCT (Janke&Kunkel, Staufen); Mikro-Kühlzentrifuge 202 MK (Sigma, Osterode); Mikroskop Axiovert 40CFL (Zeiss, Oberkochen); PCR-Gerät (quantitative PCR) *Light Cycler 480 II* (Roche); PCR-Gerät (Thermocycler) PTC-100, PTC-200 (MJ-Research, USA); *Power Supply* PP2000 (Biometra, Göttingen); Sequenzer ABI 377 XXL, automatisch (Applied Biosystems, Weiterstadt) mit Computer (Apple MacIntosh);

Sicherheitswerkbank *Steri Flow* (Heraeus, Hanau); Vortex VF2 (IKA, Staufen); Waage R160 P-D1 (Sartorius, Göttingen); Wasserbad *Aqualine AL18* (Lauda, Lauda-Königshofen); Fluoreszenz-Detektionsgerät *Fluorchem E* (Biozym); Zentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg); Zentrifuge (Maxi-Präparation) (DuPont, USA); Zentrifuge *MegaFuge 1.0R* (Heraeus, Hanau).

2.1.6 Kits

BCA Protein Assay Kit (Pierce USA)

Cell Proliferation assay Kit (BrdU Incorporation) (Roche)

Endotoxin-free plasmid purification Kit (Macherey Nagel)

GenElute HP Plasmid Miniprep Kit (Macherey Nagel)

Nucleospin Gel and PCR Clean-Up Kit (Macherey Nagel)

QiaQuick Gel Extraction Kit (Qiagen)

VenorGem Classic Mycoplasma Detection Kit (Minerva Biolabs)

2.1.7 Vektoren

pcDNA3 (Invitrogen) (Abbildung 12)

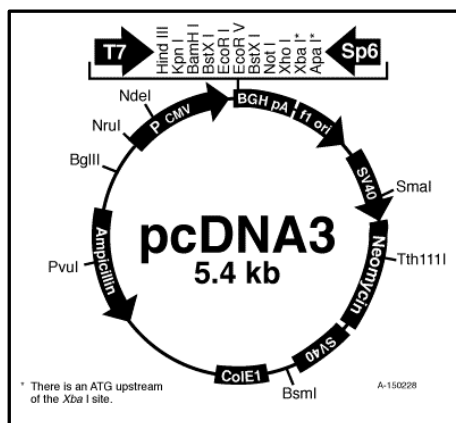


Abbildung 12: Schematische Darstellung des für die Transfektion verwendeten pcDNA3-Vektors mit Antibiotikaresistenzgen (Ampicillin/Neomycin) *multi-purpose cloning site* und Expressionsmodulen. Das Ampicillin-Resistenzgen ermöglicht eine bakterielle Selektion, das Neomycin-Resistenzgen dient der Selektion eukaryotischer Zellen mit Hilfe von Gentamycin (verändert nach Invitrogen).

2.1.8 Enzyme

Antarctic Phosphatase (NEB Biolabs, USA)

DNase I (RNase frei) (Merck, Darmstadt)

EcoRV-HFTM (NEB Biolabs, USA)

MMLV- *Reverse Transkriptase* (Invitrogen, USA)

Not I-HFTM (NEB Biolabs, USA)

Phusion *High Fidelity* DNA Polymerase (NEB Biolabs, USA)

PVU I-HFTM (NEB Biolabs, USA)

RiboLock RNase Inhibitor (Fermentas, USA)

TaqPolymerase („LaborTaq“ AG Prawitt)

T4 DNA Ligase (NEB Biolabs, USA)

2.1.9 Oligonukleotide

CaSR Primer <i>Forward</i>	5'- TCT GTA CAG GGG ATG AGA AC -3'
CaSR Primer <i>Reverse</i>	5'- CGT TGT AAT ACC CGA CTT CC -3'
CaSR Exon 5-6 <i>Forward</i>	5'- TAG CAG TCT ACT CCA TTG CCC -3'
CaSR Exon 5-6 <i>Reverse</i>	5'- GAG GTG CCA GTT GAT GAT GGA -3'
CaSR <i>Outer Primer Forward</i>	5'- GAT TGA GGA AGG CAG AAA TGG -3'
CaSR <i>Outer Primer Reverse</i>	5'- ATT CGG GGC ATT TGA TGT GTC -3'
CaSR <i>Nested Forward</i> (mit XhoI Schnittstelle (rot))	5'- AGC AGT CTC GAG AGA CGG CAG AAC CAT GGC A-3'
CaSR <i>Nested Reverse</i> (mit XbaI Schnittstelle (rot))	5'- AGC AGT TCT AGA AGT CTG GGG CGA TTC CTC T-3'
CaSR Sequenzierung 1	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAGG G -3'
CaSR Sequenzierung 2	5'- CGA GCC CAA AAG AAG GGG-3'
CaSR Sequenzierung 3	5'- GAA CTG GGT GGG CAC AAT-3'
CaSR Sequenzierung 4	5'- CAA CAG CTC GAC AGC CTT-3'
CaSR Sequenzierung 5	5'- TGG AGT GTC CTG ATG GGG-3'
CaSR Sequenzierung 6	5'- AAC CAA CCG TGT CCT CCT-3'
CaSR Sequenzierung 7	5'- GCC GTA GAG GTG ATT GCC-3'
CaSR Sequenzierung 8	5'- GAG CCT CAG AAG AAC GCC-3'

2.1.10 Antikörper

2.1.10.1 Primäre Antikörper

Monocl. Rabbit-Anti-Human AKT Antibody #9272

Fa. Cellsignaling Technologies
(Boston, USA)

Monocl. Rabbit-Anti-Human phospho AKT (S473) Antibody #4051

Fa. Cellsignaling Technologies
(Boston, USA)

Monocl. Mouse-Anti-Human beta-Actin (AC-74) Antibody #A5441

Fa. Sigma (Steinheim)

<i>Monocl. Mouse-Anti-Human</i> CaSR (5C10) Antibody #NB120-19347	<i>Fa. Novus Biologicals</i> (Littleton, USA)
<i>Monocl. Mouse-Anti-Human</i> ERK1/ERK2 Antibody # MAB15761	<i>Fa. R&D Systems</i> (Minneapolis, USA)
<i>Monocl. Mouse-Anti-Human</i> phospho ERK1 (T202/Y204) / ERK2 (T185/Y187) Antibody # MAB1825	<i>Fa. R&D Systems</i> (Minneapolis, USA)
<i>Polycl. Rabbit-Anti-Human</i> phospho SHC (T239/240) Antibody #2434	<i>Fa. Cellsignaling Technologies</i> (Boston, USA)
<i>Polycl. Rabbit-Anti-Human</i> phospho Paxillin (Y118) Antibody #2541	<i>Fa. Cellsignaling Technologies</i> (Boston, USA)
<i>Monocl. Rabbit-Anti-Human</i> phospho CREB (S133) Antibody #9198	<i>Fa. Cellsignaling Technologies</i> (Boston, USA)
<i>Polycl. Rabbit-Anti-Human</i> phospho SAP/JNK (T183/Y185) Antibody #9251	<i>Fa. Cellsignaling Technologies</i> (Boston, USA)
<i>Monocl. Rabbit-Anti-Human</i> phospho P90RSK (S380) Antibody #11989	<i>Fa. Cellsignaling Technologies</i> (Boston, USA)
<i>Polycl. Rabbit-Anti-Human</i> phospho SRC (Y416) Antibody #2101	<i>Fa. Cellsignaling Technologies</i> (Boston, USA)

2.1.10.2 Sekundäre Antikörper

<i>Polycl. Goat Anti-Rabbit</i> Immunoglobuline/HRP	<i>Fa. Dako</i> (Glostrup, DK)
<i>Polycl. Rabbit Anti-Mouse</i> Immunoglobuline/HRP	<i>Fa. Dako</i> (Glostrup, DK)
<i>Alexa Fluor488 Goat anti-Mouse</i>	<i>Fa. Invitrogen</i> (Eugene, USA)

2.1.11 Zelllinien

2.1.11.1 786-O (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville Maryland)

Die Zelllinie 786-O stammt aus dem Primärtumor eines klarzelligen Adenokarzinoms eines 58-jährigen männlichen Patienten. Sie besitzt einen triploiden Chromosomensatz, eine epitheliale Morphologie und bildet Mikrovilli und Desmosomen aus (www.ATCC.org, www.cell-lines-services.de). Mit Hilfe mehrerer Nachweise konnte die Zelllinie 786-O als CaSR-negativ charakterisiert werden (Vergleich Abschnitte: 2.2.1.1.3; 2.2.2.4; 2.2.2.6)

2.1.11.2 HEK-293 (*Human Embryonic Kidney - 293*)

HEK-293-Zellen sind gesunde Nierenzellen epithelialen Ursprungs. Die Zelllinie ist epithelialer Morphologie und exprimiert einen hypertriploiden Chromosomensatz. HEK-293-Zellen gelten als leicht transfizierbar (www.ATCC.org).

2.1.11.3 HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*)

HUVEC-Zellen wurden im REPAIR-Lab der Pathologie der Universitätsmedizin Mainz aus der Nabelschnur postnatal isoliert und wurden mit freundlicher Genehmigung für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.1.12 Bakterienstämme

E.coli DH5 α : F-, supE44, hsdR17, recA1, _lacU169, θ 80dlacZ_M15, end A1, gyrA96, (rk-.mk+), thi-1, relA1, supE44, λ - (www.lifetechnologies.com).

2.1.13 Gewebeproben

Die für die Extraktion des CaSR-Gens verwendeten Gewebeproben stammen alle aus extrahiertem gesunden bzw. tumorösen Nierengewebe von am NZK-erkrankten Patienten. Die Entnahme und die Verwendung der Gewebe für Forschungszwecke geschahen mit ausdrücklicher Genehmigung der Patienten.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR - *Polymerase chain reaction*)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion handelt es sich um eine Technik, einen beliebigen Nukleinsäureabschnitt nach natürlichem Vorbild der Replikation *in vitro*

millionenfach zu vervielfältigen. Für die Durchführung einer PCR werden neben der Vorlage, oder auch Matrize, die durch eine doppelsträngige DNA repräsentiert wird, zwei synthetisch hergestellte Oligonukleotide, sogenannte *Forward-* und *Reverse-Primer*, benötigt, die aufgrund ihrer Struktur den zu amplifizierenden Abschnitt *up-* und *downstream* festlegen. Da in dieser Arbeit mit mehreren PCR-Methoden und unterschiedlichen Polymerasen und Primern gearbeitet wurde, werden diese im Folgenden genauer behandelt. Alle Arbeiten an Nukleinsäuren wurden mit freundlicher Genehmigung der AG Prawitt in den Laboratorien der Kinderklinik der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

2.2.1.1.1 *Outer* PCR

Aufgrund der Sequenzeigenschaft des CaSR und der angrenzenden Regionen war es nicht möglich, das Gen des CaSR mit Hilfe einer PCR direkt zu amplifizieren, klonieren und transfizieren. Es konnte mit Hilfe von Primerblast kein geeignetes Primerpaar konstruiert werden. Es wurde stattdessen mit zwei PCR-Methoden gearbeitet, der *Outer* und *Nested* bzw. *Inner* PCR. Zur Vorbereitung der *Outer* PCR wurde ein Primerpaar kreiert, welches zwar höchst spezifisch den CaSR amplifizieren konnte, jedoch die gewollte Produktgröße zum einen verdoppelte und zum anderen ein Produkt mit Start-Codon (ATG) im *open reading frame* (ORF) produzierte (Vergleich Abschnitt 2.1.9). Die *Outer* PCR wurde mit Hilfe eines *Block-Cyclers* (Biometra) sowie der Polymerase Phusion von Fynnzymes in einem 50 µl Ansatz durchgeführt. Die Zusammensetzung des PCR *Mastermixes* sowie die Bedingungen des PCR-Laufs sind im Folgenden beschrieben (Tabelle 1 und Tabelle 2).

Tabelle 1: Pipettierschema für den PCR-Ansatz der *Outer* PCR für 50 µl

Aqua dest.	28,5 µl
Phusion <i>Buffer</i> (5x)	10 µl
10 mM dNTPs (200 µM each)	4 µl
<i>Outer</i> Primer <i>Forward</i> (1:10)	2,5 µl
<i>Outer</i> Primer <i>Reverse</i> (1:10)	2,5 µl
Phusion Polymerase	0,5 µl
Complete cDNA Matrize	2 µl

Tabelle 2: Temperatureinstellungen des Block-Cycler Programms für die *Outer* PCR

94°C	Pause	Hot Start	} 35 Zyklen
94°C	30 s	Denaturierung (Initial)	
94°C	10 s	Denaturierung	
61°C	30 s	<i>Annealing</i>	
72°C	1:50 Min.	Elongation	
72°C	10 Min.	Elongation (Final)	
4°C	Pause	Abkühlen	

Die Produkte wurden nach Beendigung des Laufes bei -20°C eingefroren.

2.2.1.1.2 *Nested/Inner* PCR

Um das Problem des großen Produktes sowie des zusätzlichen Start Codons im ORF zu beseitigen, wurde ein unspezifisches Primerpaar für die *Nested* PCR kreiert, welches ein deutlich kleineres Produkt produzierte (Vergleich Abschnitt 2.1.9). Hierbei wurde der *Forward*-Primer in das Start Codon gelegt. Durch die Integration der Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *Xho*I und *Xba*I wurden Produkte erstellt, die für den direkten Einsatz im pcDNA3-Vektorsystem vorgesehen waren. Aufgrund der deutlich längeren Sequenz und der damit verbunden höheren Schmelzpunkte der Primer wurde von einer *3-Step* PCR auf eine *2-Step* PCR umgestellt. Die Zusammensetzung sowie Bedingungen des PCR-Laufs waren wie folgt (Tabelle 3 und Tabelle 4):

Tabelle 3: Pipettierschema für den PCR-Ansatz der *Inner/Nested* PCR für 50 µl

Aqua dest.	28,5 µl
Phusion <i>Buffer</i> (5x)	10 µl
10 mM dNTPs (200 µM each)	4 µl
<i>Outer</i> Primer <i>Forward</i> (1:10)	2,5 µl
<i>Outer</i> Primer <i>Reverse</i> (1:10)	2,5 µl
Phusion Polymerase	0,5 µl
<i>Outer</i> PCR Produkt	2 µl

Tabelle 4: Temperatureinstellungen des Block-Cycler Programms für die *Inner/Nested* PCR

94°C	Pause	Hot Start	} 35 Zyklen
94°C	30 s	Denaturierung (Initial)	
94°C	10 s	Denaturierung	
72°C	1:50 Min.	Elongation	
72°C	10 Min.	Elongation (Final)	
4°C	Pause	Abkühlen	

Die Produkte wurden wiederum bei -20°C für weitere Analysezwecke aufbewahrt.

2.2.1.1.3 Standard-PCR zum Nachweis des CaSR

Zum Nachweis des CaSR in den transfizierten Zelllinien wurden neben durchflusszytometrischen Analysen und Western Blot auch Überprüfungen auf Nukleinsäure-Ebene durchgeführt. Hierfür wurde eine Standard Taq Polymerase der AG Prawitt verwendet. Die dabei verwendete Rezeptur für *Mastermix* und Bedingungen für den Block-Cycler sind im Folgenden beschrieben (Tabelle 5 und

Tabelle 6):

Tabelle 5: Pipettierschema für die Standard PCR für den Nachweis des CaSR (25 µl)

Aqua dest.	12 µl
PCR-Puffer (10x)	5 µl
10 mM dNTPs (200 µM each)	4 µl
CaSR Primer <i>Forward</i> (1:10)	1,5 µl
CaSR Primer <i>Reverse</i> (1:10)	1,5 µl
Taq Polymerase	0,5 µl
cDNA aus CaSR Klon x	0,5 µl

Tabelle 6: Temperatureinstellungen des Block-Cycler Programms für den Nachweis des CaSR mit Hilfe der PCR

60°C	Pause	Vorheizen	} 35 Zyklen
94°C	4 Min.	Denaturierung (Initial)	
94°C	30 s	Denaturierung	
61°C	30 s	<i>Annealing</i>	
72°C	1 Min.	Elongation	
72°C	4 Min.	Elongation (Final)	
4°C	Pause	Abkühlen	

2.2.1.1.4 Sequenzierungs-PCR

Zur Sicherstellung der Reinheit der CaSR-Sequenzen vor den Transfektionsversuchen wurden die in Abschnitt 2.2.1.6.6 aufgereinigten Plasmid-DNAs mit Hilfe einer Sequenzierung überprüft. Hierbei wurde speziell auf InDel (*Insertions/Deletions*)- und Basenaustauschmutationen geachtet, die eine Überexpression der Transgene nach Transfektion negativ beeinflussen könnten. Als Vorlage der Sequenzier-Reaktion diente die Kettenabbruch-Synthese von Sanger (Sanger et al., 1977). Dabei wurden in einer PCR neben herkömmlichen dNTPs sogenannte ddNTPs (Didesoxynukleotid-Triphosphate) eingesetzt, die anstelle der 3'-OH-Gruppe einen fluoreszierenden Farbstoff tragen. Durch den Einbau der ddNTPs während eines PCR-Laufs im *Cycler* kam es unweigerlich zum Abbruch der Neustrangsynthese und somit zur Bildung von Amplifikaten unterschiedlicher Länge. Aufgrund der fluoreszierenden Farbstoffe der ddNTPs konnte die Sequenz mit Hilfe eines Sequenzier-Automaten entschlüsselt werden. Die PCR wurde in einem *Block-Cycler* durchgeführt und die Bedingungen werden im Folgenden beschrieben (Tabelle 7 und Tabelle 8):

Tabelle 7: Pipettierschema für den Sequenzierungs-Ansatz (10 µl)

BigDye-Sequenzierungsmix	2 µl
BigDye Sequenzierungs-Puffer	1 µl
Primermix	1 µl
DNA	2 µl
Aqua dest.	4 µl

Tabelle 8: Temperatureinstellungen des *Block-Cycler* Programms für die Sequenzierungs-Reaktion

60°C	Pause	Vorheizen	} 25 Zyklen
96°C	4 Min.	Denaturierung (Initial)	
96°C	10 s	Denaturierung	
50°C	5 s	<i>Annealing</i>	
72°C	1 Min.	Elongation	
72°C	4 Min.	Elongation (Final)	
4°C	Pause	Abkühlen	

Nach erfolgtem PCR-Lauf wurde der BigDye-Sequenzierungs-Ansatz in 10 µl Aqua dest., 2 µl 3M Na-Acetat (pH5) und 60 µl Ethanol abs. aufgenommen und für 30 Min. bei 13.000 rpm und 10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400 µl Ethanol (70 %) gewaschen. Das Pellet wurde im Anschluss bei 37°C vollständig getrocknet, kurz vor der Sequenzierung in 15 µl Formamid resuspendiert und in eine spezielle 96-Well Platte überführt. Die Detektion der Fluoreszenzmarkierten Basen erfolgte am *Genetic Analyzer Avant 3100* der Kinderklinik und die Auswertung der Rohdaten wurde mit Hilfe des Programms Sequencher 4.1 (Gene Codes Corporations Inc., USA) durchgeführt.

2.2.1.1.5 Mykoplasmen-PCR

Mykoplasmen sind intra- sowie extrazelluläre, Zell-parasitierende Bakterien, die aufgrund ihrer geringen Größe im Lichtmikroskop nicht nachweisbar sind. Sie gelten zu der gefährlichsten Kontamination der Zellkultur, da sie sowohl das Wachstum der Zellen als auch die Ergebnisse von analytischen Versuchen entscheidend beeinflussen können. Aus diesem Grund war es sinnvoll, monatliche Routineuntersuchung mit Hilfe des Mykoplasmen Kits *VenorGem Classic* der Firma Minerva Biolabs durchzuführen. Das Test-Prinzip basiert auf der Amplifikation der 16S rRNA der Mykoplasmen mit Hilfe einer PCR. Hierfür wurden 500 µl Überstand aus einer konfluent gewachsenen Zellkulturflasche entnommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das Gefäß wurde bei 95°C für 10 Min. inkubiert und direkt im Anschluss für 5 Sekunden (Sek.) bei 13.000 rpm zentrifugiert. 2 µl des Überstands wurden in der folgenden PCR-Reaktion eingesetzt (Tabelle 9 und Tabelle 10):

Tabelle 9: Pipettierschema des *Mastermix* für die PCR des Mykoplasmen-Tests (25 µl)

Aqua dest.	14,5 µl
PCR-Puffer (10x)	2,5 µl
Primer-/Nukleotid-Mix	2,5 µl
Interne Kontrolle	2,5 µl
Taq Polymerase	1 µl
Zellkultur-Überstand	2 µl

Tabelle 10: Temperatureinstellungen des *Block-Cycler* Programms für den Mykoplasmen-Test

94°C	Pause	Vorheizen	} 39 Zyklen
94°C	2 Min.	Denaturierung (Initial)	
94°C	30 s	Denaturierung	
55°C	30 s	<i>Annealing</i>	
72°C	30 Sek.	Elongation	
72°C	2 Min.	Elongation (Final)	
4°C	Pause	Abkühlen	

Die PCR-Produkte wurden nach Beendigung des Laufs auf ein Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe elektrophoretischer Auftrennung analysiert. Bei positivem Mykoplasmen-Befund wurden die Zellkulturen fachgerecht entsorgt.

2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Nach jeder PCR wurden zur Kontrolle der Amplifikate Agarose-Gelelektrophoresen durchgeführt. Zur Vorbereitung wurde ein 1 %-iges Agarosegel hergestellt. Hierfür wurde 1 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer (1x) in einem Erlenmeyerkolben mit einer Mikrowelle zum Sieden gebracht. Nachdem sich die Agarose komplett gelöst hatte, wurde der Kolben kurz abgekühlt und das noch flüssige Gel in eine geeignete Gelkammer etwa 7 mm dick gegossen. Nach Entfernung der Luftblasen wurde ein Gelkamm zur Bildung von Taschen eingesteckt. Nach dem Abkühlen und Aushärten des Gels wurde es in einer horizontalen Elektrophoresekammer mit weiterem TBE-Puffer großzügig überschichtet und der Kamm gezogen. Von den zu untersuchenden Proben wurden jeweils 10 µl mit 3 µl Ladepuffer (*Orange Dye*) vermischt. In die erste Tasche wurde ein Molekulargewichtsmarker (1 kb) pipettiert, gefolgt von den zu untersuchenden Proben. Die Kammer wurde verschlossen und an einen *Power Supply* angeschlossen. Zu Beginn der Auftrennung wurde eine Spannung von 100 Volt (V) gewählt, die nach ca. 15 Min. auf 130 V erhöht wurde. Nach Ende der gelelektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel vorsichtig in ein Ethidiumbromid-Bad überführt und nach ca. 15 Min. in einem Wasserbad entfärbt. Mit Hilfe eines UV-Detektionsgeräts wurde das Gel zum Abschluss dokumentiert und fotografiert.

2.2.1.3 Aufreinigung von DNA

Die Aufreinigung von Nukleinsäuren in den hier verwendeten molekular-biologischen Verfahren war ein wichtiger Schritt um eventuelle Verunreinigungen, wie Nukleotid- oder Pufferreste, zu beseitigen. Hierfür wurden zwei verschiedene Methoden angewendet.

2.2.1.3.1 Aufreinigung von DNA mit Hilfe von kommerziellen Kits

Die Aufreinigung von DNA aus PCR-Ansätzen oder aus einem Restriktionsverdau wurde mit dem *Nucleospin Gel and PCR Clean-Up Kit* der Firma Macherey Nagel durchgeführt. Das Prinzip beruht ganz allgemein auf der Bindung von Nukleinsäuren auf einer Silica-Säule die mit chaotropen Salzen versehen ist, und der anschließenden Aufreinigung durch Ethanol und Elution mit Aqua dest.

Im ersten Schritt wurde die gelöste DNA mit dem zweifachen Volumen NTI-Puffer versetzt und in eine Säule transferiert. Nach Bindung an der Silica-Membran wurde die Säule bei 11.000 g für 30 Sek. zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die gebundene DNA wurde im Anschluss mit 700 µl Waschpuffer NT3 gewaschen und der Waschschrift wiederholt. Nach einem zweiminütigen Zentrifugationsschritt zur Trocknung der DNA wurde die Säule in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und 30 µl NE-Puffer direkt auf die Silica-Membran pipettiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde die Säule zur Elution der DNA für 1 Min. bei 11.000 g zentrifugiert. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.2.1.3.2 Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel

Der für die *Nested* PCR essentielle Schritt der Aufreinigung der durch die *Outer* PCR gewonnenen DNA Fragmente wurde mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* der Firma Qiagen durchgeführt. Nach einer Ethidiumbromid-Färbung wurde das zu extrahierende DNA-Stück mit Hilfe einer UV-Lampe und einem Skalpell aus dem

Gel herausgetrennt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Wiegen des extrahierten Gelstücks wurde es im dreifachen Volumen QG-Puffer 10 Min. bei 50°C auf einem Laborschüttler gelöst. Der pH-Wert wurde im Anschluss bestimmt und falls nötig mit 3 M Natriumacetat auf pH5 eingestellt. Im Anschluss wurde das dem ursprünglichen Gelstück entsprechende Volumen Isopropanol hinzugefügt. Die Säulen wurden nun mit dem Puffer-Isopropanol-Gemisch beladen. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 11.000 g für 1 Min. wurde der Durchfluss verworfen und die Säule mit 750 µl PE-Puffer 2x gewaschen. Die Säule wurde danach in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 30 µl Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) direkt auf die Membran pipettiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurde die Säule zur Elution der DNA für 1 Min. bei 11.000 g zentrifugiert. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C in einem Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.1.4 Enzymatischer DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Der Verdau von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen diente zum einen der Generierung von kompatiblen Schnittstellen bei der Klonierung und zum anderen der Überprüfung einer generierten DNA-Sequenz anhand der Größe. In beiden Fällen wurden 20 µl eines *Mastermix* hergestellt. Hierfür wurden 10 µg Plasmid DNA mit je 1 µl der Restriktionsenzyme XhoI und XbaI in 2 µl enzym-spezifischen Puffer ad 20 µl Aqua dest. angesetzt. Der Verdau wurde für 16 Stunden (Std.) in einem Wasserbad bei 37°C über Nacht (üN) durchgeführt und am nächsten Morgen die Reaktion bei 65°C für 20 Min. abgestoppt.

2.2.1.5 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Um die Konzentration von Nukleinsäuren zu bestimmen und nachfolgende Schritte nicht durch eventuelle Verunreinigungen zu gefährden, wurde am Ende jeder Aufreinigung und nach dem Verdau durch Restriktionsendonukleasen die Konzentration an einem NanoDrop Photometer überprüft. Nukleinsäuren haben ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm. Bei dieser Wellenlänge wird die Absorption der

Probe gemessen und mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Nukleinsäure-Konzentration ermittelt. Durch Bestimmung des Quotienten aus OD_{260} und OD_{280} lassen sich Aussagen über die Reinheit von Nukleinsäuren treffen. Der Idealwert für DNA liegt bei 1,8, der für RNA bei 2,0.

2.2.1.6 Klonierung von DNA

Die Klonierung von DNA wurde in einem *Multistep*-Prozess durchgeführt, der angefangen mit der Herstellung chemokompetenter Bakterienzellen über die Transformations- und Ligationsreaktion bis zur eigentlichen Klonierung reicht. Die verschiedenen Teilschritte werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

2.2.1.6.1 Herstellung chemokompetenter Bakterienzellen

Damit die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien ein Plasmid aufnehmen konnten, mussten sie zuvor mit einer nach Hanahan modifizierten Methode verändert werden (Hanahan, 1985). Hierfür wurden die Zellen einer Calciumchlorid-Behandlung unterzogen. Zur Herstellung chemokompetenter Bakterien wurden 7,5 ml SOB-Medium mit einem E.coli DH5 α Klon in einem Rundbodenröhrchen ün für 16 Std. bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die optische Dichte der Bakterien-suspension bei 550 nm im Photometer gemessen und beim Erreichen des Wertes 0,5 weiter verwendet. Die Suspension wurde nun auf zwei gekühlte 50 ml PP-Röhrchen aufgeteilt und bei 1800 rpm und 4°C für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellpellets mit je 15 ml Tfb1-Puffer vorsichtig resuspendiert und für 1 Std. auf Eis inkubiert. Die Röhrchen wurden ein weiteres Mal für 6 Min. bei 1800 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Pellets wurden in je 2 ml Tfb2-Puffer resuspendiert und die Bakterienzellen zu je 200 μ l Aliquots in vorgekühlten Eppendorf-Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Aliquots bei -80°C im Gefrierschrank gelagert.

Um die Chemokompetenz der Bakterienzellen zu testen wurden 50 µl eines Aliquots mit pcDNA3-Vektor in einer Konzentration von 1 ng/µl transformiert, auf Selektions-Agarplatten ausgestrichen und für 16 Std. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die gewachsenen Kolonien auf den Agarplatten ausgezählt und die Kompetenz der Bakterien nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{CfU (colony-forming unit)} = \text{Kolonienzahl} \times \frac{1 \mu\text{g}}{\text{Plasmidmasse (in } \mu\text{g)}} \times \frac{\text{Gesamtvolumen}}{\text{ausplattiertes Volumen}}$$

Bei Werten $>10^7$ war eine Transformation theoretisch möglich.

2.2.1.6.2 Phosphatase-Behandlung des pcDNA3-Vektors

Nach dem Verdau der aus der *Nested* PCR gewonnenen PCR-Produkte (Vergleich Abschnitte 2.2.1.1.2 und 2.2.1.4) musste der pcDNA3-Vektor auf die anstehende Transformation vorbereitet werden. Hierfür wurde zunächst ebenfalls ein Verdau mit den Restriktionsenzymen XhoI und XbaI durchgeführt. Nach Aufreinigung der Proben sowie Konzentrationsbestimmung wurde die Phosphatase-Behandlung des Vektors durchgeführt. Diese diente in erster Linie als Schutz vor einer Religation des Vektors und somit zu einer Erhöhung der Transformationseffizienz. Hierfür wurden 2 µg (~20 µl) Vektor-DNA mit 1 µl *Antarctic Phosphatase* und 2 µl *Antarctic Phosphatase* Reaktionspuffer (10x) für 15 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach einer abschließenden Hitzebehandlung zur Inaktivierung der Phosphatase wurde mit der Ligation begonnen.

2.2.1.6.3 Ligation

In der Ligationsreaktion wurden die spezifisch-geschnittenen CaSR-Konstrukte an den kompatiblen Schnittstellen des pcDNA3-Vektors mit Hilfe der T4 DNA Ligase verknüpft. Die Ligase ist dabei in der Lage, Phosphodiesterbindungen zwischen den 3'-OH-Gruppen des einen und den 5'-Phosphatgruppen des anderen Partners zu verknüpfen. Für eine optimale Effizienz der Ligation wurden Vektor und Konstrukt im molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt, da ein Überschuss an Insert-DNA die

Religations-Wahrscheinlichkeit des Vektors verringert. Hierfür wurden 2 µl (~100 ng) Vektor DNA, 15 µl (~300 ng) CaSR-Insert, sowie 2 µl Ligasepuffer (10x) mit ATP und 1 µl T4 DNA Ligase in einem 20 µl Ansatz vorbereitet und üN bei 16°C im Wasserbad inkubiert.

2.2.1.6.4 Transformation

Am Tag nach Beginn der Ligation wurde der komplette Ansatz mit 100 µl chemo-kompetenten DH5α-Bakterien versetzt und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Mit Hilfe eines Hitzeschocks für exakt 50 Sek. bei 42°C wurde die Membran der Bakterien permeabilisiert, sodass diese das pcDNA3.CaSR-Konstrukt aufnehmen konnten. Nach einem zweiminütigen Inkubationsschritt bei 4°C wurden die Bakterien mit 1 ml SOC-Medium (enthält Glucose) versorgt und auf einem Schüttler bei 37°C für 1 Std. inkubiert. Danach wurden die Ansätze mit Hilfe eines Drigalski-Spatels in den Konzentrationen 100 µl, 200 µl und 300 µl auf Ampicillin-haltige Agarplatten ausgestrichen und für 24 Std. im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurden die üN gewachsenen Klone mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze gepickt und eine Kontroll-PCR mit den Standard-Primern des CaSR durchgeführt. Bei Bestätigung der erfolgreichen Transformation wurden CaSR-positive Klone in einer Plasmid-Präparation weiterverwendet.

2.2.1.6.5 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmiden aus Bakterienkulturen wurde durchgeführt, um ein Vehikel für die Transfektion des CaSR, GFP und des leeren pcDNA-Vektors zu erhalten. Initial wurde eine Mini-Präparation mit vielen Klonen durchgeführt. Bei positivem Ergebnis wurden die Plasmide eines oder mehrerer Klone in einer Maxi-Präparation isoliert. Für die Mini-Präparation wurden zu Beginn 5 µl eines positiv getesteten Bakterienklons in 5 ml LB-Ampicillin-Medium in einem Rundbodenröhrchen bei 37°C für 16 Std. üN auf einem Schüttler bei 150 rpm kultiviert. Am nächsten Morgen wurden zum einen für den späteren Gebrauch 500 µl der

gewachsenen Kultur 1:1 mit Glycerinlösung (65 % Glycerin / 0,1 M MgSO₄ / 25 mM TrisHCl) bei -80°C weggefroren. Zum anderen wurde mit dem Rest der Bakterien-suspension eine Mini-Präparation mit dem *GenElute HP Plasmid Miniprep Kit* der Firma Sigma durchgeführt. Die Extraktion der Plasmide basiert bei dieser Methode auf der von Birnboim und Doly 1979 durchgeführten alkalischen Zellyse (Birnboim et al., 1979). Zur Durchführung der Mini-Präparation wurde nach Vorgabe des Kits 1 ml der Bakterien-suspension in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 12.000 g für 1 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl RNase A-haltigem Puffer mit einem Vortex resuspendiert. Nach Zugabe von weiteren 200 µl Lysepuffer (alkalisch) wurde das Reaktionsgefäß mehrere Male invertiert und 5 Min. auf Eis inkubiert. Zur Neutralisierung des alkalischen Gemischs und zur Beseitigung von Zelltrümmern, SDS und chromosomaler DNA wurden 300 µl Neutralisationspuffer des Kits hinzugegeben und nach mehrmaligem Invertieren bei 12.000 g für 10 Min zentrifugiert. Durch den Zentrifugationsschritt wurden die Zellbestandteile voneinander getrennt. Das Pellet wurde verworfen und mit dem klaren, Plasmid-haltigen Überstand weitergearbeitet. Bevor der Überstand auf die Säule des Kits übertragen wurde, musste diese mit *Column Preparation Solution* aktiviert werden. Hierfür wurden 500 µl Plasmidlösung auf die Säule pipettiert, für 30 Sek. bei 12.000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Der Plasmid-haltige Überstand wurde mit Hilfe eines Zentrifugationsschritts (12.000 g, 30 Sek.) auf die Silica-Membran der Säule übertragen und mit Hilfe von zwei verschiedenen Waschpuffern (Puffer 1 und 2) gereinigt. 500 µl Waschpuffer 1 dienten der Beseitigung von Endotoxinen an der Membran und 750 µl Ethanol-haltiger Waschpuffer 2 zur Entfernung von verbliebenen Salzen. Zwischen jedem Waschschritt wurde die Säule für 30 Sek. bei 12.000 g zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Membran eine weitere Minute zur Trocknung zentrifugiert. Die Säule wurde zum Schluss in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 30 µl Elutionspuffer direkt auf die Membran pipettiert. Nach einem fünfminütigen Inkubationsschritt wurde die Plasmid-DNA bei 12.000 g für 1 Min. zentrifugiert und die Konzentration am NanoDrop bestimmt.

2.2.1.6.6 Maxi-Präparation von Plasmid DNA

Ein Problem bei der Lyse von Bakterienzellen ist die große Anzahl an Endotoxinen, die von den Zellen speziell bei Zelltod abgesondert werden. Vor allem bei gram-negativen Bakterien, wie *Escherichia coli*, kommt es beim Zelltod durch Lyse zur Absonderung freier LPS (Lipo-Polysaccharid)-Moleküle. Für Transfektionsansätze ist es daher von Vorteil, mit einem System zu arbeiten, welches die freigesetzten Endotoxine aus der Lösung beseitigen kann. Aus diesem Grund wurde für die Präparation von Plasmiden aus Bakterienzellen im großen Maßstab mit dem *Endotoxin-free plasmid DNA purification Kit* der Firma Macherey Nagel gearbeitet. Wie auch bei der Mini-Präparation basiert das Prinzip dieser Aufreinigung auf einer modifizierten alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim and Doly, 1979). Für die Präparation einer Maxikultur wurden 600 ml LB-Ampicillin-Medium (100 µg/ml) mit einer vorbereiteten Bakterien-Minikultur versetzt und bei 37°C und 150 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Nach 16 Std. Inkubation wurde die optische Dichte der Kultur bestimmt, um das optimale Volumen des Bakterien-Lysepuffers zu berechnen. Die Kultur wurde nun für 15 Min. bei 6.000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde entsprechend der Vorgabe des Kits in 24 ml *Resuspension Buffer RES-EF* resuspendiert und die Zellen mit 24 ml *Lysis Buffer LYS-EF* durch fünfmaliges Invertieren lysiert. Während einer fünfminütigen Inkubation der Lysate bei RT wurde eine Säule (*Nucleobond Xtra Maxi*) mit einer Filtereinheit (*NucleoBond Xtra Column Filter*) bestückt und mit 35 ml *Equilibration Buffer EQU-EF* äquilibriert. Nach der Inkubation wurden 24 ml *Neutralization Buffer NEU-EF* auf das Lysat gegeben, um die Lysereaktion zu neutralisieren. Durch mehrmaliges Invertieren wurde ein Farbumschlag von blau zu transparent erzwungen, der ebenfalls einen Unterschied in der Konsistenz von schleimig-viskos zu einer homogen-klaaren Konsistenz bewirkte. Nach Zugabe des Neutralisationspuffers wurde die Bakteriensuspension für 5 Min. auf Eis inkubiert und anschließend auf die vorbereitete Säule gegeben. Nach Durchfluss des Lysats durch die Filtereinheit wurde die Säule mit 10 ml *Filter Wash Buffer FIL-EF* gewaschen und die Filtereinheit im Anschluss verworfen. Die Säule wurde nun mit 90 ml *Wash Buffer ENDO-EF* gereinigt und danach mit 45 ml *Wash Buffer WASH-EF* beladen. Nach dem

letzten Waschschrift wurde das Plasmid mit 15 ml *Elution Buffer ELU-EF* aus der Säule in ein 50 ml PP-Röhrchen eluiert und die Konzentration der DNA am NanoDrop bestimmt. Durch diese Messung konnte zum einen die Effizienz der Aufreinigung und zum anderen das optimale Volumen an Aqua dest. zur Rekonstitution der Plasmid-DNA bestimmt werden. Für den Abschluss der Maxi-Präparation wurde mit den *Nucleobond Finalizern* gearbeitet, die sich für die Aufreinigung von Vektoren mit geringerer Größe (<50kb) eignen. Zur Präzipitation wurden 10,5 ml Isopropanol zu dem Eluat gegeben und nach kurzem Vortexen für 2 Min. inkubiert. Das Präzipitat wurde nun vorsichtig durch eine Spritze mit angeschraubtem *Finalizer* gedrückt und der Durchfluss verworfen. Nach einem Waschschrift mit 4 ml Endotoxin-freiem Ethanol (70 %) wurde der *Finalizer* durch fünfmaliges „Leerspritzen“ mit Luft getrocknet. Zur Elution der Plasmid-DNA wurden 800 µl Endotoxin-freies Aqua dest. in die Spritze geladen und das Eluat vorsichtig auf ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß übertragen. Nach Überprüfung des Ergebnisses mit Hilfe der Sequenzierung (Vergleiche Abschnitt 2.2.1.1.4) konnte die Transfektion durchgeführt werden. Hierfür wurde die Vektoren-DNA mit Hilfe des Restriktionsenzym PVUI von New England Biolabs bei 37°C im Wasserbad ün linearisiert. Am nächsten Morgen wurde eine Aufreinigung wie in Abschnitt 2.2.1.3.1 beschrieben durchgeführt und die Konzentration des Eluats am NanoDrop ermittelt.

2.2.1.7 RNA-Isolation

Die Isolation von RNA aus Zellkulturen wurde mit dem *RNeasy Mini Kit* der Firma Qiagen durchgeführt. Hierfür wurden Zellen wie in Abschnitt 2.2.2.2.1 beschrieben auf einer 10 cm Zellkulturschale ausplattiert und bis zu einer Konfluenz von etwa 70 % kultiviert. Das Medium wurde 24 Std. vor Extraktion durch Serum-freies Medium ersetzt. Die Zellen wurden nun mit 500 µl RLT-Puffer (+ β-Mercaptoethanol) aus dem Kit versetzt, mit einem Zellschaber von der Oberfläche gelöst und in ein 1,5 ml RNase-freies Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm für 3 Min. wurde der Überstand in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß überführt und im Anschluss mit 500 µl Ethanol (70 %)

resuspendiert. Das Gemisch wurde nun auf eine *RNeasy Mini Spin Column* übertragen, für 15 Sek. bei 8.000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um die DNA aus der Probe zu entfernen wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierfür wurden 350 µl RW1 Puffer aus dem Kit direkt auf die Membran der Säule pipettiert und 15 Sek. bei 8.000 g zentrifugiert. Pro Säule wurden 80 µl DNase-Inkubationslösung (10 µl DNase Stock + 70 µl RDD Puffer aus dem Kit) direkt auf die Membran pipettiert und für 15 Min. bei RT inkubiert. Durch einen erneuten Waschschrift mit 350 µl RW1 Puffer wurde der DNase-Verdau beendet. Auf die Membran wurden 2x 500 µl RPE Puffer des Kits gegeben und die Säule für 15 Sek. bei 8.000 g zentrifugiert. Nach einem einminütigen Trocknungsschritt der Membran in der Zentrifuge bei 10.000 g wurde die Säule in ein frisches RNase-freies Reaktionsgefäß überführt. Zur Elution der RNA wurden 35 µl RNase-freies Aqua dest. auf die Membran pipettiert, für 5 Min. inkubiert und für 1 Min. bei 8.000 g zentrifugiert. Die Konzentration der RNA wurde am Nanodrop ermittelt.

2.2.1.8 cDNA-Synthese

Mit Hilfe einer Reversen Transkriptase ist es möglich mRNA in cDNA umzuschreiben. Durch diese Methode kann der Nachweis erbracht werden, ob ein transfiziertes Konstrukt in den Wirtszellen in RNA transkribiert wurde. Hierfür wurden 2 µg der aus der RNA-Extraktion gewonnenen Proben auf ein Volumen von 20 µl mit Aqua dest. verdünnt und für 10 Min. bei 70°C denaturiert. Während einer Abkühlungsphase auf Eis wurde der MMLV (Moloney Mäuseleukämievirus)-Reverse Transkriptase *Mastermix* pipettiert und zu der verdünnten RNA gegeben (Tabelle 11).

Tabelle 11: Pipettierschema für den *Mastermix* der Reversen Transkriptase-Reaktion

Oligo dT (0,5 µg/µl)	1 µl
dNTPs (2,5 mM each)	3,5 µl
RiboLock RNase Inhibitor	2 µl
<i>First Strand Buffer</i> (5x)	8 µl
DTT (0,1 M)	4 µl
MMLV Reverse Transkriptase	1,5 µl

Die Mixtur wurde in einen *Block-Cycler* transferiert und bei 37°C für 100 Min. inkubiert. Die Reaktion wurde mit der Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 90°C für 10 Min. abgeschlossen und die Produkte in einer Agarose-Gelelektrophorese untersucht.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Steriles Arbeiten

Alle Arbeiten an den Zellen, die Sterilität benötigten, wurden an der sterilen Werkbank durchgeführt. Die Reagenzien und Medien wurden vor jedem Versuch im Wasserbad auf 37°C erwärmt und vor Benutzung mit Reinigungsalkohol desinfiziert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und einer CO₂-Atmosphäre von 5 % im Brutschrank.

2.2.2.2 Arbeiten mit humanen Zelllinien

2.2.2.2.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Die für die Versuche hergestellten transfizierten Zellen wurden im Kulturmedium Amniomax C100 Basal Medium (+ Amniomax C100 Supplement + G418) und je nach Versuchsanordnung in Zellkulturflaschen mit einer effektiven Wachstumsfläche von 25 cm², 75 cm² bzw. 175 cm² kultiviert. Bei konfluentem Wachstum (etwa 70 - 80 %) wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen dreimal mit 10 ml DPBS gewaschen um Zelltrümmer, abgestorbene Zellen und Medienreste zu entfernen. Um die adhärenierten Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen wurde 1 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben. Nach einer zellspezifisch kurzen Inkubationsphase im Brutschrank wurde die Trypsin-EDTA-Reaktion mit 9 ml Kulturmedium abgestoppt. Nach Resuspendierung mit einer 10 ml Pipette zum vereinzeln der Zellkonglomerate wurden die Zellen entweder in eine neue Zellkulturflasche und/oder für weitere Versuche in 15 ml bzw. 50 ml PP-Röhrchen überführt.

2.2.2.2 Konservierung humaner Zelllinien

Zur Konservierung überschüssiger Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierfür wurden nicht verwendete Zellen aus Abschnitt 2.2.2.1 zunächst in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt und für 5 Min. bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und je nach Pelletgröße mit 1 ml Amniomax Kulturmedium + 10 % DMSO resuspendiert. Das DMSO diente dem Frostschutz der Zellen; ohne DMSO würden diese bei direktem Einfrieren platzen. Die Zellen wurden im Anschluss in Kryoröhrchen à 1 ml aliquotiert und in einem Nalgene *Cryo Freezing Container* bei -80°C üN inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und bis auf weiteres eingelagert.

2.2.2.3 Auftauen humaner Zelllinien

Zum Auftauen wurden die Zellen für ein paar Minuten in einem Wasserbad bei 37°C erwärmt. Unter sterilen Bedingungen wurde der Inhalt des Kryoröhrchens vorsichtig in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt und mit der fünffachen Menge an Amniomax Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden im Anschluss für 5 Min. bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in neuem Kulturmedium resuspendiert und je nach Größe in eine mittelgroße bzw. große Zellkulturflasche überführt.

2.2.2.4 Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Suspension wurde die Neubauer-Zählkammer eingesetzt. Diese besteht aus vier Großquadraten von denen jedes nochmals in 16 Kleinquadrate unterteilt ist. Die Zellzahl wurde mit Hilfe folgender Auswertungsformel bestimmt:

$$\text{Zellen pro } \mu\text{l Volumen} = \frac{\text{ausgezählte Zellen}}{\text{Ausgezählte Fläche (mm}^2\text{)} \times \text{Kammertiefe (mm)} \times \text{Verdünnungsfaktor}}$$

Für die Auszählung wurden 10 µl Zellsuspension vorsichtig zwischen Kammer und Deckgläschen pipettiert. Hierbei wurden lediglich die Zellen gezählt, die sich unmittelbar in den vier Großquadranten, bzw. an zwei Seiten eines jeden Großquadrats befanden.

2.2.2.3 Transfektion von Plasmiden

In dieser Arbeit wurde die Technik der stabilen Transfektion genutzt, um das Gen für den CaSR in die Zelllinien HEK-293 und 786-O einzubringen und somit eine Überexpression des Fremd-Konstrukts zu initiieren.

2.2.2.3.1 Bestimmung der Selektionseffizienz

Im Konstrukt des pcDNA3-Vektors ist neben der *multi-purpose cloning site* ein Gen für die Resistenz gegenüber Antibiotika vertreten. Dies wird in der Transfektion genutzt, um die Zellen zu selektionieren. Dabei sind nur Zellen in der Lage in einem bestimmten Antibiotika-Medium zu wachsen, die das komplette Konstrukt aufgenommen haben. Nicht-transfizierte Zellen oder solche, die das Konstrukt an falscher Stelle eingebaut haben, werden durch das Selektionsmedium zerstört. Initial muss vor der Selektion die optimale Antibiotika-Konzentration festgestellt werden. Hierfür wurden Zellen beider Zelllinien in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen/ml in 6-Well Schalen ausplattiert und μ N bei 37°C im CO₂-Inkubator aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde das Antibiotikum in Kulturmedium angesetzt und in aufsteigenden Konzentrationen (50, 100, 200, 300, 400, 600 mg/l) auf die Zellen gegeben. Das Wachstum wurde im Anschluss für etwa 8-10 Tage beobachtet und 3x wöchentlich das Medium gewechselt. Für die weiteren Versuche wurden die Konzentrationen 400 mg/l für die Selektion und 200 mg/l als Kulturmedium, um den Selektionsdruck aufrecht zu halten, gewählt.

2.2.2.3.2 Die Transfektion des CaSR

Zur Transfektion der Plasmid-DNA in humane Zelllinien wurde das *Turbofect Transfection Reagent* der Firma Thermo Scientific eingesetzt. Das kommerzielle Verfahren basiert auf der Verwendung kationischer Polymere. Die Polymere sind in der Lage, kompakte, stabile und positiv geladene Komplexe mit DNA zu bilden und diese sowohl vor Degradation zu schützen als auch das Einbringen in Zielzellen zu erleichtern. Am Tag vor der Transfektion wurden 2×10^5 Zellen/Well in einer 6-Well Zellkulturschale in Aliquots à 4 ml ausplattiert und in bei 37°C im CO_2 -Inkubator kultiviert. Des Weiteren wurden die aufgereinigten Plasmid-DNAs (pcDNA.blank, pcDNA.GFP und pcDNA.CaSR) wie in Abschnitt 2.2.1.6.6 linearisiert und bis zur Transfektion bei 4°C aufbewahrt. Am Tag der Transfektion wurden je $4 \mu\text{g}$ DNA in $400 \mu\text{l}$ serumfreiem Medium gelöst. Nach kurzem Vortexen des Transfektionsreagenz wurden je $6 \mu\text{l}$ Turbofect zu jedem Ansatz pipettiert, resuspendiert und für 30 Min. bei RT gelagert. Pro Well der 6-Well Platte wurden im Anschluss $400 \mu\text{l}$ Transfektions-Mixtur pipettiert und vorsichtig resuspendiert. Die transfizierten Zellen wurden im Anschluss im CO_2 -Inkubator für 36 Std. kultiviert.

2.2.2.3.3 Selektion der transfizierten Zellen

Zur Selektion der transfizierten Zellen wurden diese nach 36 Std. vorsichtig mit DPBS gewaschen, trypsinisiert in Selektionsmedium (enthält 400 mg/l Gentamycin) aufgenommen und gezählt. Beim Ausplattieren auf mehrere 10 cm Zellkulturschalen wurden verschiedene Konzentrationen eingesetzt, um eine effiziente Verteilung und das Absterben der nicht-transfizierten Zellen zu gewährleisten. Jeden zweiten Tag wurde das verbrauchte Selektionsmedium durch Neues ersetzt. Die ersten Effekte der Selektion wurden nach etwa 8-12 Tagen sichtbar: Der Großteil der Zellen in den Zellkulturschalen ging zu Grunde und vereinzelt manifestierten sich Zellen, denen das Antibiotika-haltige Selektionsmedium nichts auszumachen schien. Um diese vereinzelt Zellen entwickelten sich im Laufe weniger Tage kreisförmige Zellverbände, die aus dem ursprünglichen Klon meiotisch hervorgegangen waren. Zur Gewinnung der Zellverbände wurden diese zunächst an der Unterseite der Zell-

kulturschale markiert und dann vorsichtig mit DPBS gewaschen. Da potentiell mehrere dieser Klone pro Zellkulturschale vorkommen konnten, diese aber unbedingt einzeln „gepickt“ werden mussten, konnte nicht mit großen Mengen Trypsin-EDTA-Lösung gearbeitet werden. Zur Vorbereitung wurden Filterpapiere, die auch für Western Blot-Analysen verwendet werden, mit einem Locher ausgestochen und hitzesterilisiert. Die Membranen wurden für wenige Minuten in Trypsin-EDTA-Lösung eingelegt und vorsichtig auf dem Zellverband angebracht. Nach einer kurzen Inkubation wurde die Membran mit Hilfe einer sterilen Pinzette aus der Zellkulturschale entnommen und in eine 25 cm² Zellkulturflasche überführt. Zum Stoppen der Trypsin-EDTA-Reaktion wurden 3 ml Selektionsmedium (Kulturmedium + 200 mg/ml Gentamycin) hinzugegeben und die Flasche vorsichtig geschwenkt. Im Idealfall gelangten die Zellen aus der Membran zum Boden der Zellkulturflasche. Nach fünf Tagen wurde die Membran entnommen und das Medium erneuert. Nach Erreichen einer Konfluenz von etwa 70 % wurden die Zellen in eine 75 cm²-Zellkulturflasche überführt und für weitere Versuche kultiviert.

2.2.2.4 Durchflusszytometrische Analysen des CaSR

In einer durchflusszytometrischen Analyse ist es möglich, funktionelle Unterschiede bei Antikörper-gefärbten Zellen zu bestimmen. Hierfür werden die Zellen in einem FACS-Gerät stark vereinzelt, mit einem Laserstrahl detektiert und anhand deren Charakteristika ein zweidimensional-kumulatives Abbild erschaffen. In dieser Arbeit diente die durchflusszytometrische Analyse zur Kontrolle der Transfektion des CaSR. Die in Western Blot und PCR als positiv eingestuften Klone der CaSR-transfizierten 786-O bzw. HEK-293-Zellen wurden hierfür verwendet. Die unterschiedlichen Zellen wurden zwecks Versuchsdurchführung wie in 2.2.2.2.1 beschrieben passagiert und in 15 ml PP-Röhrchen überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 1200 rpm und 5 Min. wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 10 ml DPBS resuspendiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt zu gleichen Bedingungen. Nach Absaugen des Überstandes wurde jedes Pellet zur Fixierung der Zellen in 1 ml Paraformaldehyd (PFA 4 %) aufgenommen. Nach einem zehn-

minütigen Inkubationsschritt wurde das Pellet einmal mit DPBS gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abermals durch 10 ml frisches DPBS getauscht. Während der Waschschrte wurden die primären Antikörperlösungen angesetzt. Pro Messung wurden je 100 µl Antikörperlösung benötigt. Dabei wurde die Rezeptur für die Herstellung der Lösung streng nach Herstellerangaben befolgt (CaSR: 6 µl Stock ad 100 µl DPBS (1 % BSA) = 100 µM = 2 Ansätze / IgG Isotypenkontrolle: 2,4 µl Stock ad 100 µl DPBS (1 % BSA) = 100 µM = 1 Ansatz). Nach erfolgter Resuspendierung wurde die Zellsuspension, wie in 2.2.2.2.4 beschrieben, gezählt und auf 5×10^6 Zellen/ml in DPBS (1 % BSA) eingestellt. Von jedem Klon wurden dabei 3×100 µl benötigt. Jeder Messansatz wurde entweder mit 100 µl CaSR-Antikörperlösung oder 100 µl IgG-Kontroll-Antikörperlösung versehen. Gegen Ende des 60-minütigen Inkubationsschrittes wurden die lichtsensitiven Sekundär-Antikörperlösungen hergestellt (200 µl/Messung). Hierbei wurde ebenfalls streng nach Herstellerangaben gearbeitet (Alexa Fluor488 1:1000 in 200 µl DPBS (1 % BSA)). Nach dem Inkubationsschritt mit den Primär-Antikörpern wurden die Zellen 2x mit DPBS gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wurde durch die Sekundär-Antikörper-Lösungen ausgetauscht, gevortext und für 30 Min. bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden im Dunkeln durchgeführt. Die Zellen wurden erneut mit DPBS gewaschen, zentrifugiert und in 500 µl DPBS aufgenommen. Im letzten Arbeitsschritt vor der Messung wurden die Zellen in Durchflusszytometer-geeignete Rundbodenröhrchen aus Polypropylen überführt, ausreichend beschriftet und bis kurz vor Verwendung bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die durchflusszytometrischen Analysen wurden mit freundlicher Genehmigung im Institut der Pathologie im REPAIR-Lab am FACSCalibur der Firma BD Biosciences durchgeführt.

2.2.2.5 Phospho Kinase-Array

Der Phospho Kinase-Array ARY003B der Firma R&D Systems ist eine Hochdurchsatzmethode um den Phosphorylierungsstatus von insgesamt 46 verschiedenen intrazellulären Kinasen zu untersuchen. Dabei ist die Auswahl der unterschiedlichen

Kinasen so angelegt, dass die wichtigsten Signalwege abgedeckt sind. Der Phospho Kinase-Array wurde mit der wildtypischen Zelllinie 786-O und dem positiven CaSR-Klon 786-O.CaSR1, sowie unterschiedlichen Behandlungsformen beider Zelllinien durchgeführt. Hierbei sollten Unterschiede in den Mustern der an der Signaltransduktion beteiligten intrazellulären Kinasen gezeigt werden, die anschließend in Western Blot-Analysen zu verifizieren waren.

2.2.2.5.1 Herstellung eines Gesamtprotein-Extraktes aus Zellkulturen für den Phospho Kinase-Array

Pro Zelllinie wurden je 5×10^6 Zellen in vier 10 cm Zellkulturschalen ausplattiert. Bei annähernd 70 %-iger Wachstumskonfluenz wurde das Kulturmedium durch 10 ml Medium ohne Serum ausgetauscht. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die Behandlung:

- 1 Schale als Kontrolle ohne Behandlung
- 1 Schale 5 mM Calciumchlorid (30 Min.)
- 1 Schale 10 mM NPS2143 (1 Std.)
- 1 Schale 10 mM NPS2143 (1 Std.) + 5 mM Calciumchlorid (30 Min.)

Nach der Behandlung wurden die Zellen einmal mit eiskaltem DPBS gewaschen und mit 500 μ l Lysepuffer für wenige Minuten inkubiert. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und rasch gevortext. Nach einem 30-minütigen Inkubationsschritt bei 4°C wurden die Zelllysate für 10 Min. bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in neue 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Proteinkonzentrationsmessung erfolgte wie in Abschnitt 2.2.2.6.2 beschrieben.

2.2.2.5.2 Phospho Kinase-Array - Versuchsdurchführung

Die Zelllysate wurden anhand der vorgegebenen Konzentrations- und Volumenmaxima und -minima mit Lysepuffer 6 und Array Puffer 1 aus dem Kit eingestellt,

sodass die eingesetzte Proteinmenge pro Membran 300 µg betrug. Währenddessen wurden pro Phospho Kinase-Array acht Membranen (vier A; vier B) für 1 Std. bei RT auf einem Taumeltisch mit Array Puffer 1 äquilibriert. Zur Bindung an den Primärantikörpern wurden pro Proteinprobe je 1 ml Suspension (300 µg) auf je eine A- und eine B-Membran gegeben und 1h bei 4°C auf einem Taumeltisch inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde die Proteinsuspension entfernt und die Membranen 3x mit 10 ml Waschpuffer gewaschen. Alle A-Membranen wurden im Anschluss mit 1 ml Antikörperlösung A (20 µl Detektions-Antikörper Cocktail A + 980 µl Array Puffer 2/3) inkubiert, wohingegen alle B-Membranen mit 1 ml Antikörperlösung B (20 µl Detektions-Antikörper Cocktail B + 980 µl Array Puffer 2/3) auf einem Schüttler für 2 Std. inkubiert wurden. Während eines weiteren Waschschriffs (3x 10 Min. mit 1x Waschpuffer) wurde die sekundäre Streptavidin-*Horse-Raddish-Peroxidase* (HRP)-konjugierte Antikörperlösung in 1x Array Puffer 2/3 hergestellt. Die Membranen wurden nun in der sekundären Antikörper-Lösung für 30 Min. auf einem Taumeltisch bei RT inkubiert, gefolgt von weiteren Waschschriffen (3x 10 Min. mit 1x Waschpuffer). Nach gründlicher Beseitigung der Pufferreste wurden die Membranen passend zueinander in Klarsichtfolien gelegt und 1 Min. mit *Lightning Plus-ECL Enhanced Luminol Reagent Plus* inkubiert. Die Auswertung erfolgte am *Chemiluminescence-Detector* Fluorchem E von Biozym und die Bearbeitung der Daten mit Hilfe von Excel 2010.

2.2.2.6 Western Blot-Analysen

2.2.2.6.1 Herstellung eines Gesamtprotein-Extraktes aus Zellkulturen für Western Blot-Analysen

Für eine Gesamt-Protein-Extraktion aus Zellkulturen wurden 5×10^6 Zellen auf einer 10 cm Zellkulturschale ausplattiert und kultiviert. Bei einer Konfluenz von etwa 70 % wurde das Kulturmedium abgesaugt und gegen Medium ohne Serum ausgetauscht. Nach 24 Std. Inkubation wurden die Zellen je nach Versuchszweck entweder mit Calcium, NPS2143, Cinacalcet oder einer Kombination behandelt oder aber als Negativkontrolle ohne Behandlung weiter verwendet. Nach Behandlungsende

wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit eisgekühltem DPBS vorsichtig gewaschen. Die Zellen wurden nun mit 500 µl Zellysepuffer inkubiert, mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturschale gelöst und in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch einen Vortex-Schritt wurden die Zell-Konglomerate vereinzelt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 14.000 rpm und 4°C für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Messung der Proteinkonzentration (vgl. Abschnitt 2.2.2.6.2) wurden die Proteine bis zu einer Western Blot-Analyse bei -20°C gelagert.

2.2.2.6.2 Messung der Proteinkonzentration

Um die Verwendung einer homogenen Proteinmenge im Western Blot zu gewährleisten, wurden die Proteinkonzentrationen der Zellextrakte mit Hilfe eines *BCA Protein Assay Kits* der Firma Pierce bestimmt. Das Prinzip beruht dabei auf einer Biuret-Reaktion, bei der die Aminogruppen der Proteine Kupfer-II-Ionen zu Kupfer-I-Ionen reduzieren. Es kommt zur Komplexbildung mit den BCA-Molekülen, die sich in einem violetten Farbumschlag manifestiert. Die Färbung korreliert dabei mit der Proteinmenge und kann mit Hilfe eines ELISA-Readers photometrisch gemessen werden.

Zur Vorbereitung mussten die Zellysate aufgrund der zu erwartenden, für die Messung zu hohen, Konzentration 1:5 verdünnt werden. Zu diesem Zweck wurden je 15 µl Lysat mit 60 µl Aqua dest. vermischt. Parallel dazu wurde nach Protokoll von Pierce die BCA-Standardreihe hergestellt und die für den Versuch korrekten Volumina des Reaktionsgemischs *Protein Assay Reagent A+B* berechnet. In jedes Eppendorf-Reaktionsgefäß (Standardreihe und Zellysate) wurden je 600 µl des Gemischs Reagenz A und B gegeben und resuspendiert. Jedes Gefäß wurde nun in Triplikaten auf eine 96-Well Plate gegeben und anschließend für 30 Minuten im CO₂-Inkubator gelagert. Die Messung erfolgte am ELISA-Reader2000 der Firma Anthos mit dem Programm ADAP bei 595 nm. Die Auswertung der optischen Dichten wurde mit Hilfe von Microsoft Excel 2010 durchgeführt.

2.2.2.6.3 Fällung von Proteinen

Mit Hilfe der gemessenen Proteinkonzentration aus 2.2.2.6.2 wurden die Volumina der Proteinextrakte errechnet, die 200 µg Protein entsprachen. Die entsprechenden Volumina der Protein-Stocklösung wurden in ein neues 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit dem neunfachen Volumen Aceton bei -20°C üN inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proteine bei 14.000 rpm und 4°C für 10 Min. zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Trocknung des übrigen Acetons wurden die geöffneten Reaktionsgefäße für 20 Min. bei 37°C inkubiert und die Proteine in 50 µl Ladepuffer (2x) aufgenommen. Nach erfolgter Resuspendierung wurden die Proteine entweder direkt in die Gelkammern aufgetragen oder für weitere Versuche bei -20°C gelagert.

2.2.2.6.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für diese Arbeit wurde mit einer diskontinuierlichen SDS (*Sodium-Dodecyl-Sulfate*)-PAGE gearbeitet, die mit einem Trenngel (7,5 % bei besonders großen Molekülen bzw. 10 % bei Molekülen <100 kDa) und einem Sammelgel (4 %) durchgeführt wird.

Zur Vorbereitung der SDS-PAGE wurden die Trenn- und Sammelgele nach Anleitung 2.1.2 hergestellt. Während der Polymerisierung der Gele wurden die gefällten Proteine für 10 Min. bei 100°C denaturiert und nach einem kurzen Zentrifugationsschritt auf Eis inkubiert. Die Gelkammern wurden nun in der Elektrophorese-Apparatur befestigt und die Kammer mit 1x Rotiphorese-Gelelektrophoresepuffer befüllt. In die erste Tasche der Gele wurde eine Kombination aus 2,5 µl Magic Mark XP und 4 µl Bench Mark pipettiert, die nach Beendigung der SDS-PAGE neben der Lauffront Aussagen über die Laufweite der Proteine zuließen. In jede weitere Tasche der Gele wurden je 10 µl (entspricht 40 µg) der gefällten und in Ladepuffer aufgenommenen Proteine gegeben. Zum Start der SDS-PAGE wurde die Elektrophoresekammer an einen *Power Supply* gekoppelt und mit Strom versorgt. Es wurde ein mehrstufiges Programm erstellt, welches die Proteine in der ersten Phase bei 75 V, 300 mA und 150 Watt (W) für 25 Min. im Sammelgel hält. In der Trenngelphase (130 V, 300 mA, 150 W, ca. 90 Min.) wurden die Proteinen schließlich

anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Während des knapp 2-stündigen Laufs wurden Filterpapiere und PVDF (*poly vinylidene fluoride*)-Membranen für den Western Blot vorbereitet.

2.2.2.6.5 Western Blot

Zur weiteren Bestimmung der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine müssen diese mit Hilfe einer Spannungsquelle auf eine PVDF-Membran „geblottet“, also übertragen werden. An der Oberfläche der Membran werden die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen festgehalten. Mit Hilfe von proteinspezifischen Antikörpern lässt sich die Proteinmenge quantitativ erfassen. Die Technik stammt bereits aus den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts und ist ein Standard-Verfahren der Zellbiologie.

Kurz vor Ende der Gelelektrophorese-Phase wurden die vorbereiteten PVDF Membranen äquilibriert. Hierfür wurden die Membranen zunächst in Ethanol abs. aktiviert, dann 2 Min. in Aqua dest. gewaschen und schließlich für 5 Min. in Anodenpuffer inkubiert. Der Zusammenbau der Western Blot-Apparatur *TransBlot Turbo* von BioRad erfolgte nach folgendem Schema (Abbildung 13):

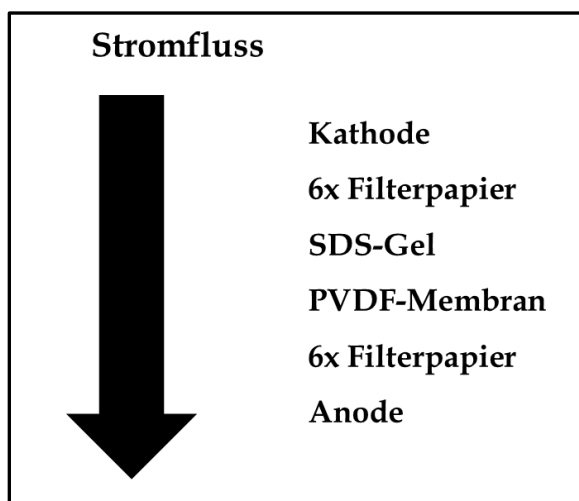


Abbildung 13 Schematischer Aufbau des Western Blots.

Bevor die Apparatur verschlossen werden konnte, mussten eventuell auftretende und das Ergebnis negativ beeinflussende Luftblasen mit einem „Roller“ beseitigt werden. Die Apparatur wurde nun an die Spannungsquelle angeschlossen und nach 30 Min. das Programm (100 V, 1 A und 150 W) gestoppt. Nach Befreiung der Membranen von eventuellen Gelresten wurden diese 1 Std. bei RT mit dem Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Zur Detektion der Proteinmengen wurden die primären Antikörper nach Herstellerangaben vorbereitet und mit den Membranen in einem 50 ml PP-Röhrchen auf einem Rollenschüttler bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung abgenommen und für weitere 2-3 Verwendungen bei -20°C gelagert. Die Membranen wurden 3x für 10 Min. mit 1x TBST (*Tris phosphate buffered Saline* + 0,1 % Tween 20) auf einem Taumeltisch gewaschen. Währenddessen wurden die sekundären Antikörperlösungen nach Herstellervorgaben 1:5000 in Blockpuffer angesetzt. Die Inkubation der sekundären Antikörper erfolgte für 1 Std. bei RT auf einem Taumeltisch. Nach weiteren 3 Waschschritten mit 1x TBST wurden die Membranen mit je 2 ml *Lightning Plus-ECL Enhanced Luminol Reagent Plus* für 1 Min. inkubiert und in Klarsichtfolien eingehüllt. Die quantitative Messung erfolgte am *Chemiluminescence-Detector* Fluorochem E von Biozym und die Auswertung der Aufnahmen mit Hilfe von Alpha View SA und Excel 2010.

2.2.2.6.6 Strippen der Membranen

Nach Messung der Proteinmenge mussten je nach Versuchszweck die gebundenen Antikörper von den Membranen gelöst werden. Hierfür wurden die Membranen zunächst für 5 Min. in Aqua dest. gewaschen, für 20 Min. mit 0,2 M Natronlauge „gestrippt“ und wiederum 5 Min. in Aqua dest. inkubiert. Vor einer weiteren Inkubation mit primären Antikörpern wurden die Membranen wiederum 1 Std. in Block-Puffer inkubiert.

2.2.2.6.7 Coomassie-Färbungen der Membranen

Zur Normalisierung der in den Western Blot-Analysen-generierten Ergebnisse wurden sowohl beta-Aktin-Antikörperfärbungen, wie in Abschnitt 2.2.2.6.5 beschrieben, durchgeführt, als auch Coomassie-Brilliant-Blau-Färbungen der kompletten Membranen angefertigt. Nach dem Strippen der Membranen wurden diese in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt und mit 10 ml Coomassie-Färbelösung für 2 Std. bei RT auf einem Rollenschüttler inkubiert. Die Entfärbung der Membranen wurde wiederum in 50 ml PP-Röhrchen überführt. Hierfür wurde die Membran 2x mit 10 ml Coomassie-Entfärbelösung auf dem Rollenschüttler inkubiert. Die Membran wurde luftgetrocknet und anschließend mit einem Scanner digitalisiert und ausgewertet.

2.2.2.7 Proliferations-Assay

Um das Proliferationspotential der CaSR-transfizierten Zelllinien zu testen wurde das kommerzielle *Cell Proliferation ELISA BrdU-Kit* der Firma Roche verwendet. Das Prinzip des Verfahrens beruht auf der BrdU (Brom-desoxyUracil)-Inkorporation während der Zellteilung. Während der DNA-Replikation der Zelle kommt es hierbei zum Einbau des Pyrimidin-Analogs BrdU statt Thymidin. Dieser Fehleinbau kann mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten Antikörpers und zugehöriger Substratreaktion detektiert werden. Die Peroxidase ist in der Lage, das Substrat des Antikörpers in einen Farbstoff umzusetzen, dessen Menge in Relation zum Einbau steht und photometrisch ausgewertet werden kann.

In den Proliferations-Assays wurde die Beeinflussung der CaSR-Transfektion der Zelllinien 786-O und HEK-293 und der Behandlung mit Calcium, NPS2143 sowie Kombination daraus auf das Proliferationsverhalten untersucht. Zu Beginn wurden die Zellen bei ausreichendem Wachstum gewaschen, gesplittet, gezählt und in einer Konzentration von 5×10^3 Zellen/Well in 100 μ l Kulturmedium auf eine 96-Well Platte in Quadrupletten ausplattiert. Nach 24 Std. Inkubation im Brutschrank wurde das Medium gegen Serum-freies Medium ersetzt. Nach weiteren 24 Std. erfolgte die Behandlung in verschiedenen Konzentrationen.

- Zellen ohne Behandlung zur Kontrolle
- Zellen mit 5 mM Calciumchlorid (30 Min.)
- Zellen mit 10 mM NPS2143 (1 Std.)
- Zellen mit 10 mM NPS2143 (1 Std.) + 5 mM Calciumchlorid (30 Min.)

Direkt nach Ende der Behandlung wurden 10 µl *BrdU-Labeling Solution* pro Well pipettiert und die Platten für 2 Std. im CO₂-Inkubator aufbewahrt. Während dieser Zeit hatten die Zellen Zeit BrdU statt Thymidin in ihre DNA einzubauen. Nach der Inkubationsphase wurden die Lösungen aus den Wells vorsichtig entfernt und die Zellen mit 200 µl/Well *Fix-Denat Solution* für 30 Min. bei RT inkubiert. Parallel dazu wurde die *Anti-BrdU-POD Working Solution* hergestellt, indem der Antikörper 1:100 mit *Dilution Solution* verdünnt wurde. Pro Well wurden nun 100 µl Antikörperlösung pipettiert und bei RT für 1 Std. inkubiert. Im Anschluss folgten drei Waschschrte mit je 200 µl/Well *Washing Solution* (1x). Nun wurden je Well 100 µl Substrate Solution in die Platten pipettiert und für 30 Min. abgedunkelt bei RT inkubiert. Mit Hilfe von Schwefelsäure (1 M) wurde die Substratreaktion abgestoppt. Hierfür wurden 25 µl H₂SO₄ in jedes Well gegeben und bei schwachem Schütteln (300 rpm) 1 Min. auf einem Laborschüttler inkubiert. Die Überstände wurden in eine neue 96-Well Platte überführt und die Absorption bei 450 nm in einem ELISA-Reader mit der Software ADAP bestimmt. Die weitere Auswertung wurde am Computer mit Hilfe von Excel 2010 durchgeführt.

2.2.2.8 Vitalitäts-Assay

Um die Auswirkungen der verschiedenen Behandlungen auf die CaSR-transfizierte Zelllinien zu testen wurden Vitalitäts-Assays mit Hilfe von MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durchgeführt. Die Zellen sind in der Lage den Tetrazoliumring des wasserlöslichen MTTs zu spalten. Das aus dieser Reaktion resultierende wasserunlösliche Salz kann mit Isopropyl-Alkohol aus den vitalen Zellen herausgelöst werden und führt zu einem blauen Farbumschlag. Die Menge des gebildeten Farbstoffs steht in Relation mit dem Grad stoffwechselaktiver Zellen und kann photometrisch ausgewertet werden.

Die Vitalitäts-Versuche wurden mit den Zelllinien 786-O, HEK-293 und allen relevanten positiven CaSR-Klonen mit und ohne Behandlung mit Calcium, NPS2143, oder einer Kombination daraus durchgeführt. Die Vorbereitung und Behandlung der Zellen wurde wie in Abschnitt 2.2.2.7 beschrieben durchgeführt und parallel zum Proliferations-Assay angesetzt. Kurz nach Behandlungsende wurden 20 µl MTT/Well auf die Zellen gegeben und die Platten bei 37°C in 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach 3 Std. Inkubation wurden die Platten gut ausgeklopft, dabei das MTT separat entsorgt und die Platten 1x mit 200 µl/Well DPBS gewaschen. Im Anschluss wurden 100 µl Isopropyl-Alkohol/Well auf die Zellen gegeben und die Platten für 15 Min. unter starkem Schütteln auf einem Laborschüttler inkubiert. Dabei löste sich das wasserunlösliche Salz und es kam zu dem beschriebenen Farbumschlag. Die Überstände wurden in eine neue 96-Well Platte transferiert. Die Messung wurde am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm (Referenz 650 nm) mit der Software ADAP durchgeführt. Zur Auswertung der Messergebnisse wurde mit Microsoft Excel 2010 gearbeitet.

2.2.2.9 Adhäsionsversuche

Die Fähigkeit der Adhäsion von Tumorzellen, speziell disseminierter Formen, ist ein essentieller Bestandteil der Metastasierung sowie der Zell-Invasion und ist auf die Wechselwirkung von verschiedenen Oberflächenmolekülen angewiesen (Mundy, 1997). Aus diesem Grund sollten in dieser Arbeit zwei spezielle Formen der Adhäsion, zum einen am Endothel und zum anderen an Komponenten der extrazellulären Matrix, Aufschluss darüber geben, ob die Transfektion des CaSR Zell-Zell- oder Zell-EZM-Interaktionen beeinflusst.

2.2.2.9.1 Die Adhäsion an Komponenten der extrazellulären Matrix

Für die Analysen der Adhäsionsfähigkeit von CaSR-transfizierten Zellen und deren Wildtyp-Äquivalent wurden speziell beschichtete 96-Well Platten verwendet, die Aminogruppen-enthaltende EZM-Komponenten binden können (Reacti-Bind

Amine-Binding, Maleic Anhydride 96-Well Plate, Pierce). Die dabei eingesetzten Komponenten waren BSA (Bovines Serumalbumin) als Kontrolle, Fibronectin, Kollagen I und Kollagen IV. Zur Herstellung der Arbeitslösungen wurden die z.T. als Lyophilisat vorliegenden Stoffe mit PBS auf eine Konzentration von 1 mg/ml gebracht. Alle EZM-Komponenten wurden schließlich in einer Konzentration von 10 µg/ml in den Adhäsionsversuchen eingesetzt.

Am Vortag des Adhäsions-Versuchs wurden die 96-Well Platten je Well mit 100 µl der einzelnen EZM-Bestandteile üN auf einem Inkubationsschüttler beschichtet. Am nächsten Morgen wurden die Lösungen entfernt und die Platten 2x mit je 100 µl/Well Waschpuffer gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren wurden in jedes Well 200 µl 0,5 % BSA in 1x DPBS pipettiert und für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Parallel zur bisherigen Prozedur wurden die einzusetzenden Zellen behandelt, gewaschen, trypsinisiert, gezählt und auf eine Konzentration von 4×10^5 Zellen/ml eingestellt. 50 µl der Zellsuspension wurden pro Well auf die 96-Well Platte gegeben und für 1 Std. bei 37°C in 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Zur Entfernung nicht adhärierter Zellen wurden die Platten 2x mit 100 µl Waschpuffer/Well gewaschen. Durch einen 15-minütigen Inkubationsschritt mit Paraformaldehyd (4 %) wurden die adhärerten Zellen fixiert. Die Detektion der adhärerten Zellen erfolgte über eine Färbung mittels Kristallviolett. Bevor die Zellen mit 50 µl/Well einer 0,5 %-igen Kristallviolett-Lösung gefärbt werden konnten, wurden sie erneut einem Waschschrift mit 100 µl/Well 1x DPBS unterzogen. Die Entfernung des nicht von den Zellen aufgenommenen Kristallvioletts erfolgte durch dreimaliges Waschen mit 100 µl Waschpuffer/Well. Die Platten wurden im Anschluss für 20-50 Min. vollständig auf einem Tuch getrocknet. Um den Farbstoff aus den Zellen zu lösen, wurden die Platten mit 100 µl/Well 2 % SDS für 30 Min. inkubiert und die Überstände in eine neue 96-Well Platte überführt. Die Messung der Absorption erfolgte im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 550 nm (Referenz 650 nm) und die Auswertung erfolgte am PC mit Microsoft Excel 2010.

2.2.2.9.2 Die Adhäsion am Endothel

Vor Aussaat der Endothelzellen in 6-Well Platten wurden diese mit 200 μ l einer 0,2 %-igen Gelatinelösung für 30 Min. im CO₂-Inkubator beschichtet. Nach Entfernung der Gelatinelösung wurden je Well 5×10^5 Zellen einer HUVEC-Zell-suspension in die Wells gegeben und bis zu konfluentem Wachstum kultiviert. Am Tag vor der Adhäsion wurden die Zelllinien 786-O und HEK-293 incl. CaSR-transfizierter Klone auf Serum-freies Medium umgestellt. Zu Versuchsbeginn wurden die Tumorzellen gewaschen, trypsinisiert und in 15 ml PP-Röhrchen überführt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen gezählt und in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml auf drei 15 ml PP-Röhrchen aufgeteilt. Daraufhin erfolgte die Behandlung der Zellen:

- Zellen ohne Behandlung
- Zellen behandelt mit 5 mM Calciumchlorid (30 Min.)
- Zellen behandelt mit 10 μ M NPS2143 (1 Std.) + 5 mM Calciumchlorid (30 Min.)

Nach der Behandlung wurde das Medium durch 1 ml frisches Medium ersetzt und im Anschluss die Zellsuspension vorsichtig auf die HUVEC-Zellen gegeben. Nach einer 2-stündigen Inkubation wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit je 1 ml/Well 1 % kalten Glutaraldehyd gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1 ml DPBS (+Ca²⁺ und Mg²⁺)/Well wurden die Zellen 10 Min. bei RT mit 1 ml 1 % Glutaraldehyd fixiert. In einem abschließenden Waschschrift wurden die Zellen mit DPBS (+Ca²⁺ und Mg²⁺) inkubiert, ehe zur weiteren Lagerung je Well 2 ml DPBS (+Ca²⁺ und Mg²⁺) gegeben wurde. Zur Auswertung wurden die Zellen mit Hilfe eines Rasterokulars (12,5 mm²) mit einer effektiven Fläche von 156,35 mm² an einem Zeiss Lichtmikroskop ausgezählt. Je Well wurden 5 Raster ausgezählt, der Mittelwert gebildet und das Ergebnis in mm² umgerechnet.

2.2.2.10 Migration von NZK-Zellen

Neben der Adhäsion ist die Migration ein wesentlicher Bestandteil der Metastasierung aller Tumoren. Zellen sind in der Lage auf chemotaktische Reize aus ihrem Milieu mit einer gerichteten Bewegung zu reagieren. Diese Eigenschaft der Zellen wurde in Form der nachfolgenden Versuche ausgenutzt, um die Wanderung der Tumorzellen zu dokumentieren. Hierfür wurden spezielle Boyden 48-Well Migrationskammern verwendet, die aus einem unteren und einem oberen Kammerteil bestehen und von einer porösen Membran (Porendurchmesser 8 μm) getrennt werden (Abbildung 14). In den unteren Teil der Kammer wurden die Chemotaxine pipettiert. In die obere Kammer wurden Tumorzellen gegeben, die innerhalb von 16 Std. die Möglichkeit hatten, durch die nur 8 μm im Durchschnitt fassenden Poren der Membran zum Chemotaxin zu wandern. Nach Durchwandern der Membran adhärten die Zellen an deren Unterseite und konnten über spezifische Färbungen der Zellkerne sichtbar gemacht und ausgezählt werden.

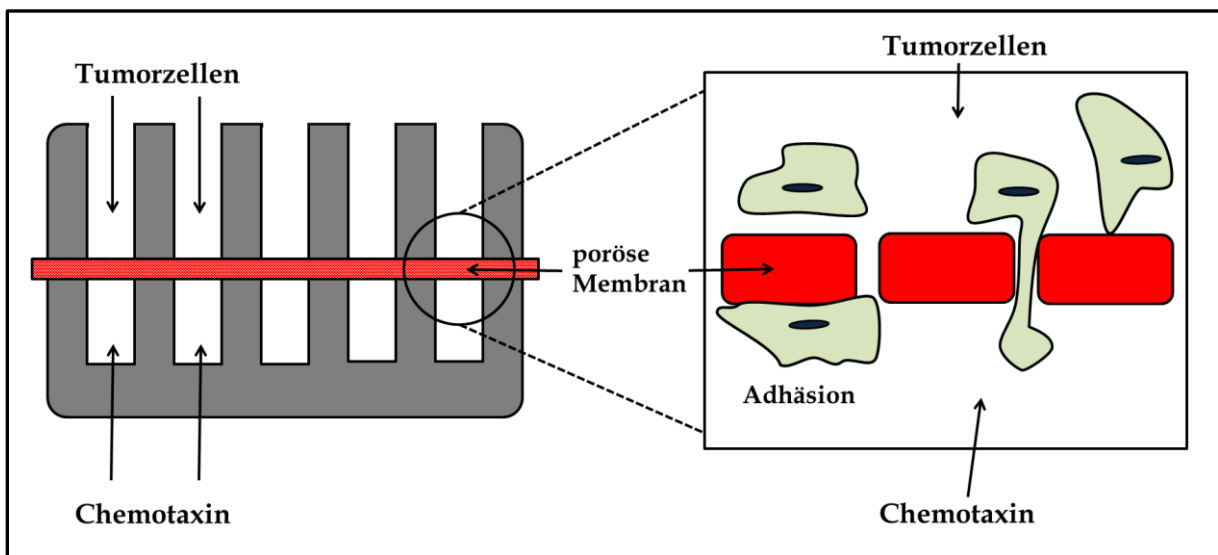


Abbildung 14: Schematische Darstellung einer Boyden Migrations-Kammer. Auf der linken Seite ist das 2-Kammersystem mit Boden und Deckel inklusive teilender poröser Membran dargestellt. Auf der rechten Seite ist der Querschnitt eines Wells mit aktiv wandernden Tumorzellen, die an der unteren Seite der porösen Membran adhären, dargestellt.

2.2.2.10.1 Vorbereitung der Zellen und Chemotaxine

In den Chemotaxis-Versuchen wurde der Einfluss der CaSR-Transfektion und der Behandlung mit NPS2143 und Cinacalcet auf das Migrationsverhalten von Zellen der Zelllinien 786-O und HEK-293 unter Verwendung der Chemotaxine Calcium und Fibronectin untersucht. Die Zellen wurden hierfür bis zu einer Konfluenz von etwa 70 % kultiviert und am Tag vor dem Migrationsversuch auf Serum-freies Medium umgestellt. Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen, trypsinisiert, gezählt und in einer Konzentration von 3×10^5 Zellen/ml auf 5x 15 ml PP-Röhrchen aufgeteilt. Die Behandlung erfolgte direkt in den PP-Röhrchen und bestand aus

- Zellen ohne Behandlung
- Zellen behandelt mit 10 μ M Cinacalcet (1 Std.)
- Zellen behandelt mit 10 μ M NPS2143 (1 Std.)

Während der Behandlung wurden die Chemotaxine Calcium und Fibronectin vorbereitet und die jeweiligen Konzentrationen (Calcium 10 mM / Fibronectin 10 μ g/ml) in Serum-freiem Medium eingestellt. Parallel wurden die porösen Polycarbonat-Membranen mehrere Minuten zur Äquilibration in DPBS eingelegt.

2.2.2.10.2 Chemotaxis-Versuch mit Hilfe der Boyden Migrationskammer

Zur Durchführung des Migrations-Versuchs wurden die unteren Kammerteile mit je 29 μ l entweder mit zur Kontrolle dienendem Serum-freiem Medium oder mit den Chemotaxin-Lösungen Calcium bzw. Fibronectin befüllt. Die Membranen wurden vorsichtig und luftblasenfrei auf den unteren Kammerteil transferiert. Zur Druckausübung auf die Membran diente ein passend zur Kammer mit Aussparungen versehenes Dichtungselement, welches auf die Membran gelegt wurde. Der obere Kammerteil wurde mit Hilfe von Schrauben auf dem unteren Kammerteil fixiert. Je 50 μ l der zuvor angesetzten Zellsuspensionen (3×10^5 Zellen/ml) wurden nach Resuspendierung in die Aussparungen im oberen Kammerteil in Quadrupletten pipettiert. Nach Beendigung des Pipettiervorgangs wurden die Migrationskammern für 16 Std. bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Am

nächsten Tag wurde das Medium im oberen Kammerteil verworfen und die Kammer geöffnet. Die Polycarbonat-Membran wurde mit zwei Pinzetten vorsichtig entnommen und in zwei Klemmen fixiert. Die ursprüngliche Oberseite der Membran wurde nun mit Puffer von Weise befeuchtet. Mit Hilfe eines Teigschabers wurden adhärenzte Zellen auf der ursprünglichen Oberseite der Membran mechanisch entfernt, da diese kein Migrationsverhalten zeigten und das Ergebnis beeinflusst hätten. Nach Wiederholung der Prozedur wurden die Zellen auf der ursprünglichen Unterseite der Membran für 1 Min. in Methanol fixiert und für ca. 10 Min. an der Luft getrocknet. Zur Markierung und Vereinfachung des Zählvorgangs wurden die Zellkerne der adhärenzten Zellen mit Hemacolor-Lösungen gefärbt. Hierfür wurde die ursprüngliche Unterseite der Membran erst dreimal durch rote Hemacolor Lösung 2 und schließlich sechsmal durch blaue Hemacolor Lösung 3 gezogen. Die Entfärbung wurde mit Puffer von Weise durchgeführt und so oft wiederholt, bis keine Farbschlieren mehr im Puffer zu erkennen waren. Nach kurzer Trockenzeit wurden die Ränder der Membran abgeschnitten und die Membranzwischenräume mit der ursprünglichen Unterseite auf einen Objektträger gelegt. Durch geringe Anfeuchtung der Membranen wurden Knicke vermieden. Auf die Membranen wurde nun großzügig Immersionsöl verteilt und die Objektträger mit einem passenden Deckglas luftblasenfrei verschlossen. Zur Einbettung wurde Nagellack an den Kanten des Deckglases verteilt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Rasterokulars (12,5 mm²) an einem Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung. Pro ursprünglichen Well wurden 10 Sichtfelder (Gesamtfläche 125 mm²) mäanderförmig ausgezählt und die Werte in einer Tabelle notiert. Die weitere Auswertung erfolgte am PC mit Microsoft Excel 2010.

2.2.2.10.3 Reinigung der Migrationskammer

Zur Reinigung der Boyden Migrationskammern wurden 5 g Terg-a-zyme in 500 ml Aqua dest. angesetzt und für 1 Std. auf 60°C erhitzt. Währenddessen wurden der obere und untere Kammerteil sowie das Dichtungselement mit Aqua dest. abgespült und nach Lösung des Terg-a-zyme für mehrere Stunden darin inkubiert. Dabei lösten

sich die Reste der Zellbestandteile und Chemotaxine. Nach dem Inkubationsschritt wurden die Kompartimente der Migrationskammer gründlich mit Aqua dest. gespült und vollständig getrocknet.

2.2.3 Statistische Auswertungen

Um Aussagen über die Signifikanz der Resultate der analytischen Experimente treffen zu können, wurden alle Versuchsansätze mindestens dreimal mit identischen Versuchsvoraussetzungen durchgeführt. Die Auswertung der statistischen Signifikanz erfolgte im Anschluss der Experimente an einem Computer mit der Software SPSS 12.0

3 Ergebnisse

3.1 CaSR-Transfektion von Nierenzellen

Um die Auswirkungen des CaSR auf die knochenspezifische Metastasierung genauer zu untersuchen, mussten zu Beginn der Experimente CaSR-exprimierende 786-O- und HEK-293-Zellen hergestellt werden. Initial hierfür wurde das Gen für den CaSR aus bereits positiv getesteten Patientenproben mit Hilfe von speziellen Primern in einer PCR amplifiziert. Das Konstrukt wurde in einen Vektor kloniert, dieser aufgereinigt und in die Nierenzellen transfiziert. Zur Kontrolle der Überexpression des CaSR wurden sowohl PCR, als auch Western Blot- und durchflusszytometrische Analysen durchgeführt.

3.1.1 Primerdesign

Aufgrund von Struktureigenschaften des Gens für den CaSR, sowie benachbarter Regionen, war es nicht möglich eine einfache PCR durchzuführen, um das Gen zu amplifizieren. Vielmehr mussten spezifische, in der 5'- und 3'-UTR (*untranslated Region*)-liegende Primerpaare hergestellt werden. Hierfür diente als Vorlage die Sequenz des CaSR-001 (Gene ID: ENSG00000036828), die von der Internet-Präsenz <http://www.ensembl.org> entnommen wurde. Die Sequenz hat eine Länge von 3783 bp (Basenpaare) (inklusive 5'- und 3'-UTR), die eine Kette mit 1078 Aminosäuren (AS) codiert (Abbildung 15). Die Primer für die zunächst durchgeführte *Outer*-PCR wurden mit Hilfe von Primerblast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/) kreiert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass der *Forward*-Primer in der 5'-UTR in der Nähe des Startcodons bindet und der *Reverse*-Primer in der 3'-UTR nach dem Ende der CaSR-Sequenz (Abbildung 15). Dieses Primerpaar war hochspezifisch für das Gen des CaSR, bot aber den Nachteil, dass große Bereiche der 3'- und 5'-UTR mit amplifiziert wurden und in diesen Bereichen keine geeigneten Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen, wichtig für die anschließende Klonierung in das pcDNA3-Vektorsystem, beinhaltet waren.

```

CAACAGCCACCTGGCTGCAGCCAGGAAGGACCCACCCCTTTCCGCCAGGAGAGTGGAAAGGAGGAGCTGTTGCCAGCACCCGAGGT
CTTCCGGCCACAGCCAAACCTTGACCTGAGTCTTCCAGAATGAAAGGCATCACAGGAGGCTCTCCATGATGTGGCTTCCAAAGACTCAA
GGACCCACCCACATTACAAGTCTGATTGAGGAAGGCAGAAATGGAGATTCAAACACCACGCTCTTCTATTATTTTATTAATCAATCT
GTAGACATGTGTCCCACTCCAGGAGTGAACCTGCTCCAAAGGAGAAAATTTCCGGAGCCCTCCAAACTTCTAGCTCTCTCCTCCCTGGC
CTGGAGAGAGCCAGAAACCATGCAATTTATAGCTGCTGCTGGTCCCTCTTGGCACTCACCTGGCACACCTCTGCCTACGG
GCCAGACCAGCGAGCCCAAAGAAGGGGACATTATCCTTGGGGGCTCTTTCTATTCAATTTGGAGTAGCAGCTAA
AGATCAAGATCTCAAATCAAGGCCGGAGTCTGTGGAATGTATCAGGTATAATTTCCGTGGTTTCGCTGGTTACAGGCT
ATGATATTTGCCATAGAGGAGATAAACAGCAGCCAGCCCTTCTTCCCAACTTGACGCTGGGATACAGGATATTTGAC
ACTTGCAACACCGTTTCTAAGGCCTTGGAAAGCCACCTGAGTTTTGTGCTCAAAACAAAATTGATTCTTTGAACCTTGA
TGAGTTCTGCAACTGCTCAGAGCACATTCCTCTACGATTGCTGTGGTGGAGCAACTGGCTCAGGCGTCTCCACGGCA
GTGGCAAATCTGCTGGGCTCTTCTACATTCCTCCAGGTCAGTTATGCCTCCTCCAGCAGACTCCTCAGCAACAAGAATC
AATTCAGTCTTTCTCCGAACCATCCCAATGATGAGCACCAGGCCACTGCCATGGCAGACATCATGAGTATTTCCG
CTGGAACCTGGTGGGCACAATTGCAGCTGATGACGACTATGGGCGCCGGGGATTGAGAAATTCGAGAGGAAGCTG
AGGAAAGGGATATCTGCATCGACTTCAGTGAACCTCATCTCCAGTACTCTGATGAGGAAGAGATCCAGCATGTGGTAG
AGGTGATTCAAAAATTCACGGCCAAAAGTCATCGTGGTTTTCTCCAGTGGCCAGATCTTGAGCCCTCATCAAGGAGAT
TGTCGGCGCAATATCACGGCAAGATCTGGCTGGCCAGCGAGGCCCTGGCCAGCTCCTCCCTGATCGCCATGCCTCA
GTACTTCCACGTGGTTGGCGGCAACATTGGATTGCTCTGAAGGCTGGGAGATCCAGGCTTCCGGGAATTCCTGAAG
AAGTCCATCCCAAGGAGTCTGTCCACAATGGTTTTGCCAAGGAGTTTTGGGAAGAAAATTTAACTGCCACCTCCAA
GAAGGTGCAAAAGGACCTTTACCTGTGGACACTTTCTGAGAGGTACGAAAGAAAGTGGCGACAGGTTTAGCAACAG
CTCGACAGCCTTCCGACCCCTCTGTACAGGGGATGAGAACATCAGCAGTGTGAGAGCCCTTACATAGATTACACGCA
TTTACGGATATCCTACAATGTGTACTTAGCAGTCTACTCCATTGCCACGCTTGCAGATATATATACCTGCTTACCTG
GGAGAGGGCTCTTACC AATGGCTCTGTGCAACATCAAGAAAGTTGAGGCGTGGCAAGTCTGAAACACCTACGGC
ATCTAAACTTTACAAACAATATGGGGGAGCAGGTGACCTTTGATGAGTGTGGTGAACCTGGTGGGAACTATTCATCAT
CAACTGGCACCTCTCCAGAGGATGGCTCCATCGTGTITAAGGAAGTGGGTATTACAACGCTTATGCCAAGAAGGG
AGAAAGACTCTTCATCAAGAGGAGAAAATCTGTGGAGTGGTTCACAGGAGGTGCCCTTCTCCAAGTGCAGCCG
AGACTGCCTGGCAGGACCAAGAAAGGGATCATTGAGGGGAGCCACCTGCTGCTTTGAGTGTGGAGTGTCTGTA
TGGGGAGTATAGTGATGAGACAGATGCCAGTGCCTGTAA CAAGTGCCAGATGACTTCTGGTCCAATGAGAACACAC
CTCCTGCATTGCCAAGGAGATCGAGTTTCTGTGCTGACGGAGCCCTTGGGATCGCACTCACCTCTTTGCCGTGCTGG
GCATTTTCTGACAGCCTTTGTGCTGGTGTGTTTATCAAGTTCGCAACACACCCATTGTCAAGGCCACCAACCGAGA
GCTCTCCTACCTCCTCCTTCTCCTGCTCTGCTGCTTCTCCAGCTCCTGTCTTTCATCGGGGAGCCCCAGGACTGGAC
GTGCCGCTGCGCCAGCCGGCTTTGGCATCAGCTTCGTGCTCTGCATCTCATGCACTCTGGTGA AAAACCAACCGTGT
CTCCTGGTGTGAGGCAAGATCCCCACCAGCTTCCACCGCAAGTGGTGGGGCTCAACCTGCAGTTCCTGCTGGTTT
TCCTCTGCACCTTCATGCAGATTGTCATCTGTGTGATCTGGCTTACACCGCGCCCCGTCAGCTACCGCAACCAGGA
GCTGGAGGATGAGATCATCTTCAACAGTGCACGAGGGCTCCTCATGGCCCTGGGCTTCTGATCGGCTACACCTGC
CTGCTGGCTGCCATCTGCTTCTTTGCTTCAAGTCCCGAAGCTGCCGGAGAACTTCAATGAAGCCAAGTTTATCAC
CTTCAGCATGCTCATCTTCTCATGCTCTGATCTCCTTATTCCAGCCTATGCCAGCACCTATGGCAAGTTTGTCTCTGC
CGTAGAGGTGATTGCCATCCTGGCAGCCAGCTTTGGCTTGTGGCGTGCATCTTCTTCAACAAGATCTACATCAATTCTCT
TCAAGCCATCCCGCAACACCATCGAAGGAGTGGTTCAGCAGCCAGCTCACGCTTTC AAGGTGGCTGCCCGGGCA
CGCTGCGCCGAGCAACGCTCTCCGCAAGCGGTCCAGCAGCCTTGAAGGCTCCACGGGATCCACCCCTCCTCTCCA
TCAGCAGCAAGAGCAACAGCGAAGACCCATTCCCAAGCCGAGAGGAGCAAGCAGCAGCAGCCGCTGGCCCTAAC
CCAGCAAGAGCAGCAGCAGCAGCCCTGACCTCCCAAGCAGCAACGATCTCAGCAGCAGCCAGATGCAAGCAG
AAGTCACTTTTGGCAGCGGCACGGTCACTTCTCACTGAGCTTTGATGAGCCTCAGAAAGAACGCCATGGCCACAGG
AATTCACGACCCAGAACTCCCTGGAGGCCAGAAAAGCAGCGATACGCTGACCCGACACGAGCCATTACTCCGCTG
CAGTGGGGGAAACGGACTTAGATCTGACCGTCCAGGAAACAAGTCTGCAAGGACCTGTGGTGGAGACCAGCGCC
AGAGGTGGAGGACCTGAAGAGTTGCTCCAGCACTTGTAGTGTCCAGTTACAGAGCTTTGTCACTAGTGGTGGAGG
CAGCACTGTTACAGAAAACTAGTGAATTCATAAAATGGAAAGGAGAACTGGGCTAGGGAGAAATGCAGAGGTTTCTTGG
GTCCAGGGAAAGAGAAATGCCCCAGACTCCTTCTCTGAGGAAGAAAGGATATAAGACACATAATGCCGAAATTTAGTCA
CACCATCTTAAATGACAGTGAATTGACCCAATGTTCCCTTT
    
```

Abbildung 15: Sequenz des CaSR inklusive ORF. Das 3783 bp große Konstrukt beinhaltet die 5'- und 3'-UTR (grau hinterlegt), sowie die grün-hinterlegten Bindestellen des Forward- und violett-hinterlegten des Reverse-Primers für die Outer-PCR. Gelb hinterlegt ist das Start-Codon ATG (verändert nach <http://www.ensembl.org>).

Nach erfolgter PCR (Vergleiche Abschnitt 2.2.1.1.1) wurde mit dem PCR Produkt eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, um die Amplifikatgröße zu kontrollieren und um das Amplifikat aufzureinigen. Hierbei zeigte sich eine Bande im Bereich von etwa 3,5 kb Größe (ohne Abbildung). Nach erfolgter Aufreinigung, wie in Abschnitt 2.2.1.3.2 beschrieben, wurde mit der *Nested*-PCR fortgefahren.

Für die *Nested*- oder auch *Inner*-PCR wurden ebenfalls spezifische Primer mit Primerblast ermittelt. Da nur mit dem aufgereinigten Amplifikat aus der *Outer*-PCR gearbeitet wurde, spielte die Spezifität der Primer für den CaSR keine entscheidende Rolle. Stattdessen wurde die Sequenz des *Forward*-Primers so gewählt, dass sie Teil des Start-Codons des CaSR war. Aufgrund der nicht vorhandenen Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme im ORF des CaSR wurde in den *Forward*-Primer eine *Xho*I-Erkennungssequenz (CTCGAG) und in den *Reverse*-Primer eine *Xba*I-Erkennungssequenz (TCTAGA) jeweils 5' eingebaut (Abbildung 16). Diese Sequenzen dienen in der anschließenden Klonierung dem gerichteten Einbau des CaSR-Konstrukts in den pcDNA3-Vektor. Zusätzlich wurde jeweils eine sechsstellige „*scrambled*“-Sequenz 5' an die Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen angehängt.

```

GATTGAGGAAGGCAGAAATGAGATTCAAACACCACGCTCTCTATTATTATTATTAATCAATCTGTAGACATGTGTCCTCCACCTCCAGGGAG
TGAACCTGCTCCAAAGGAGAAACTTCTGGGAGCCTCCAAACTCCTAGCTGTCTCATCCCTTGCCTGGAGAGCAGTCTCGAGAGAGC
GCAGAACCATGGCAATTTATAGCTGCTGCTGGGCTCTCTGGCACTCACCTGGCACAACCTCTGCCTACGGGCCAGACC
AGCGAGCCCAAAGAAAGGGGACATTATCCTTGGGGGCTCTTTCTATTCAATTTGGAGTAGCAGCTAAAGATCAAG
ATCTCAAATCAAGGCCGAGTCTGTGGAATGTATCAGGTATAATTTCCGTGGGTTTCGTGGTTACAGGCTATGATATT
GCCATAGAGGAGATAAACAGCAGCCAGCCCTTCTTCCAACTTGACGCTGGGATACAGGATATTTGACAACCTTGAAC
ACCGTTTCTAAGGCCCTTGAAGCCACCCTGAGTTTTGTGCTCAAAACAAAATTGATTCTTTGAACCTTGATGAGTTCTG
CAACTGCTCAGAGCAATTCCCTCTACGATTGCTGTGGTGGGAGCAACTGGCTCAGGCGTCTCCACGGCAGTGGCAA
TCTGCTGGGGCTCTTCTACATCCCCAGGTCAGTTATGCTCTCCAGCAGACTCCTCAGCAACAAGAATCAATTCAAG
TCTTCTCCGAAACCATCCCAATGATGAGCACCAGGCCACTGCCATGGCAGACATCATCGAGTATTTCCGTGGAACT
GGGTGGGCACAATTGACGTGATGACGACTATGGGCGGCGGGATTGAGAAATTCGAGAGGAAGCTGAGGAAAGG
GATATCTGCATCGACTTCAGTGAACCTATCTCCAGTACTCTGATGAGGAAGAGATCCAGCATGTGGTAGAGGTGATTC
AAAATTCACGGCCAAAGTCACTGTGGTTTTCTCCAGTGGCCAGATCTTGAGCCCTCATCAAGGAGATTGTCCGGCG
CAATATCACGGGCAAGATCTGGCTGGCAGCGAGGCCCTGGCCAGCTCTCCCTGATGCCATGCCTCAGTACTTCCAC
GTGGTTGGCCGCCACCATGGATTGCTCTGAAGGCTGGGCAGATCCCAGGCTTCCGGGAATTCCTGAAGAAGGTCCAT
CCCAGGAAGTCTGTCCACAATGGTTTTGGCAAGGAGTTTTGGGAAGAAAATTAACTGCCACCTCCAGAAGGTGCA
AAAGGACCTTTACTGTGGACACTTTCTGAGAGGTACGAAAGAAAGTGGCGACAGGTTTAGCAACAGCTGCACAGCC
TTCCGACCCCTCTGTACAGGGATGAGAAATCAGCAGTGTGAGACCCCTTACATAGATTACAGCATTACGGATAT
CCTACAATGTACTTAGCAGTCTACTCCATTGCCACGCCCTTGAAGATATATATACCTGCTTACCTGGGAGAGGGCT
CTTCAACAATGGCTCTGTGCAGACATCAAGAAAGTTGAGGCGTGGCAGGTCCTGAAAGCACCTACGGCATCTAAACTT
TACAAACAATATGGGGAGCAGGTGACCTTTGATGAGTGTGGTGAACCTGGTGGGAACTATTCATCAACAACCTGGCA
CCTCTCCCAGAGGATGGCTCCATCGTTTTAAGGAAGTGGGTATTACAACGCTCTATGCCAAGAAGGGAGAAAGACT
CTTCATCAACGAGGAGAAAATCTGTGAGTGGTTCTCCAGGGAGGTGCCCTTCTCAACTGCAGCCGAGACTGCCT
GGCAGGGACCAGGAAAGGATCATTGAGGGGGAGCCCACTGCTGTTGAGTGTGGAGTGTCTGATGGGGAGTA
TAGTGATGAGACAGATGCCAGTGCCTGTAAACAAGTGCCAGATGACTTCTGGTCCAAATGAGAAACAACCTCTGCAT
TGCCAAGGAGATCGAGTTTCTGTCTGGACGGAGCCCTTGGGATCGCACTCAACCTCTTTGCCGTGTGGCATTITTC
TGACAGCCTTTGTGTGGTGTGTTATCAAGTTCCGCAACAACCCATTGTCAAGGCCACCAACCGAGAGCTCTCCTA
CCTCCTCTCTTCTCCTGCTGTGCTTCTCCAGCTCCCTGTTCTTATCGGGGAGCCCAAGGACTGGACGTGCCGCT
GGCCAGCCGGCTTTGGCATCAGCTTGTGCTCTGCATCTCATGCATCCTGGTGAAACCAACCGTGTCTCTCTGGTGT
TTGAGGCCAAGATCCCAACAGCTTCCACCGCAAGTGGTGGGGCTCAACCTGCAGTTCCTGTGGTTTTCTCTGCAC
CTTCATGCAGATTTGATCTGTGTGATCTGGCTTACACCGCGCCCCGTCAGCTACCGCAACCAGGAGCTGGAGGAT
GAGATCATCTTACACGTGCCAGGAGGCTCCCTCATGGCCCTGGGCTTCTGATCGGCTACACCTGCCTGTGGCTG
CCATCTGCTTCTTTGCTTCAAGTCCCGAAGCTGCGGAGAACTTCAAAGAAGCAAGTTCATCACTTCAAGCATG
CTCATCTTCTCATGCTGTGGATCTCCTTATTCCAGCCTATGCCAGCACCTATGGCAAGTTTGTCTGTGCCGTAGAGGTG
ATTGCCATCCTGGCAGCCAGCTTTGGCTTGGTGGCTGCATCTTCTTCAACAAGATCTACATCATCTTCTTCAAGCCATC
CCGCAACCAATCGAGGAGGTGCGTTGCAAGCAGCCTGGAGGCTCCACGGATCCACCCCTCTCTCCATCAGCAGCAA
GAGCAACAGCGAAGACCCATTCCACAGCCCGAGAGGCAAGCAGCAGCAGCCGCTGGCCCTAACCCAGCAAGAG
CAGCAGCAGCAGCCCTGACCTCCACAGCAGCAACGATCTCAGCAGCAGCCAGATGCAAGCAGAGGTCATCTT
TGGCAGCGGCAAGGTCACCTTCTACTGAGCTTTGATGAGCTCAGAAAGAACGCAATGGCCACAGGAAATTTACGCA
CCAGAACTCCTGGAGGCCAGAAAGCAGCGATACGCTGACCCGACACGAGCCATTACTCCGCTGCAGTGGGGG
AAAAGGACTTAGATCTGACCGTCCAGGAAACAGGTCTGAAAGACCTGTGGTGGAGACCAGCGGCCAGAGGTGGAG
GACCCGAAAGAGTTGTCCAGCAGCTTGTAGTGTCCAGTTCAAGAGCTTTGTATCAGTGGTGGAGGCAGCACTGTTA
CAGAAAACGTAGTGAATTCATAAATGGAAAGGAGAACTGGCTAGGGAGAAATCCAGAGAGGTTTCTTGGGCTCCAGGAAAG
AGGAATCGCCCCAGACTCTAGAACTGCTCTTCTCTGAGGAAAGGATAATAGACACATCAATGCCCGGA
    
```

Abbildung 16: Sequenz des CaSR inklusive ORF nach Durchführung der *Outer PCR*. Das 3534 bp große Konstrukt beinhaltet noch Teile der 5'- und 3'-UTR (grau hinterlegt), sowie die grün hinterlegte Sequenz des *Forward-Primers*, inkl. Schnittstelle für *XhoI* (unterstrichen) und die violett-hinterlegte Sequenz des *Reverse-Primers* inkl. Schnittstelle für *XbaI* (unterstrichen) für die *Inner PCR*. Gelb hinterlegt ist das Start-Codon ATG (verändert nach <http://www.ensembl.org>).

Nach der Durchführung der *Inner* PCR (Vergleiche 2.2.1.1.2) wurde erneut eine Agarose-Gelelektrophorese samt Auswertung an einem UV-Detektionsgerät mit dem Amplifikat durchgeführt. Hierbei wurde eine Bande in Höhe von etwa 3,5 kb gemessen und mit der Klonierung fortgeföhren (Abbildung 17).

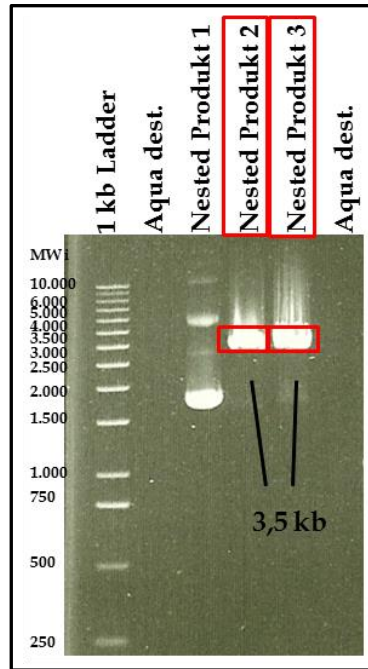


Abbildung 17: Auswertung eines Agarosegel-Bildes nach der *Nested* PCR. Die Größe der amplifizierten Produkte sollte bei etwa 3,5 kb liegen. Aufgrund der Auswertung wurde mit den Produkten 2 und 3 weitergearbeitet, wohingegen Produkt 1 verworfen wurde.

3.1.2 Die Transfektion der Transgene

Um die späteren Auswirkungen der Transfektion des CaSR und der damit einhergehenden Überexpression des Proteins vergleichbar zu machen, wurden die Nierenzellen mit drei verschiedenen pcDNA3-Konstrukten transfiziert. Neben dem pcDNA3CaSR-Konstrukt wurde hierfür der Leervektor (pcDNA3.leer) transfiziert. Als Transfektionskontrolle wurden weitere Zellen mit dem pcDNA3-Vektor transfiziert, der das Gen für das *green fluorescent protein* (GFP), welches aus der Qualle *Aequorea victoria* gewonnen wird, trägt. Zellen die das Konstrukt pcDNA3.GFP aufgenommen und in ihre DNA integriert haben, fluoreszieren bei Anregung mit blauem Licht grünlich.

Nach der Transfektion, die im Abschnitt 2.2.2.3 genauer erklärt wird, wurde mit der Selektion positiver Klone und anschließend mit dem Nachweis des transgenen CaSR fortgefahren.

3.1.2.1 PCR für den Nachweis des transgenen CaSR

Zunächst wurde die Expression des CaSR auf mRNA-Ebene mittels einer PCR nachgewiesen. Hierfür wurden mRNA-Extrakte der Zellen und der transfizierten Klone hergestellt und in cDNA transkribiert. Die PCR wurde wie in Abschnitt 2.2.1.1.3 durchgeführt. Als Primer dienten eigens in Primerblast kreierte Sequenzen, die ein Produkt in der Größe von 357 bp herstellten. Nach dem PCR-Lauf wurden die Amplifikate auf ein Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe von Ethidiumbromid und einem UV-Detektionsgerät ausgewertet. Hierbei zeigte sich für die Klone CaSR1, CaSR4 und CaSR9 der Zelllinie 786-O eine deutlich stärkere Expression des CaSR als bei den anderen positiven Klonen. Bei der Zelllinie HEK-293 zeigten die Klone CaSR1 und CaSR4 eine Expression des CaSR. Bei den übrigen Klonen konnte keine Expression nachgewiesen werden (Abbildung 18).

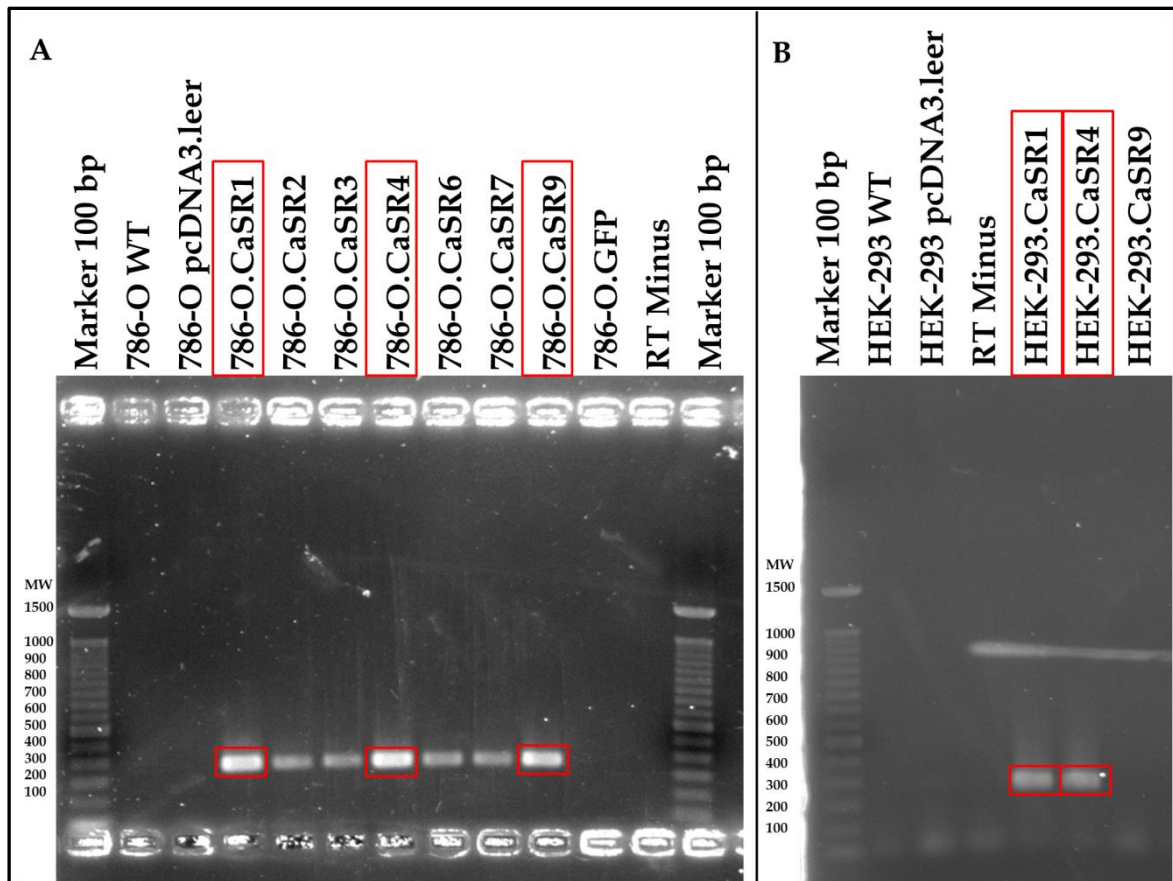


Abbildung 18: PCR zum Nachweis des transgenen CaSR. Als Primer wurde der CaSR *Forward/Reverse* Primer eingesetzt. Als Marker diente die 100 bp-*Ladder* **A** PCR mit den cDNAs der Zelllinie 786-O und Transfektanten. Die Klone 786-O.CaSR1, 786-O.CaSR4 und 786-O.CaSR9 zeigten die deutlichste Expression des CaSR. **B** PCR der cDNAs der Zelllinie HEK-293 und Transfektanten. Die Klone HEK-293.CaSR1, HEK-293.CaSR4 zeigten als einzige Klone eine Expression des CaSR auf mRNA-Ebene.

3.1.2.2 Western Blot-Analysen zum Nachweis des transgenen CaSR

Zur Überprüfung ob die Vielzahl positiver Klone den CaSR auf Proteinebene exprimieren, wurden Western Blot-Analysen mit den entsprechenden Proteinextrakten der Zelllinien 786-O und HEK-293 durchgeführt. Als Antikörper diente der *Monocl. Mouse-Anti-Human CaSR (5C10) Antibody* der Firma *novus biologicals*, der sich im Vergleich zu vielen Konkurrenzprodukten als brauchbar herausstellte. Dieser erzeugt drei spezifische Banden, die sich bei 115 kDa, 120 kDa und 150 kDa befinden und die glykosylierte Form, die unvollständig prozessierte und die nicht-glykosylierte Form des Rezeptors darstellen. Banden über 250 kDa Größe repräsentieren, so vermutet man, die dimerisierte Form des Rezeptors (Goldsmith et al., 1997). Die Analyse der Proteinmenge im Western Blot zeigte, dass trotz der Fähigkeit aller positiven CaSR-Klone im Selektionsmedium zu wachsen, nur wenige den CaSR

auf Proteinebene exprimierten. Bei der Zelllinie 786-O zeigten drei Klone (786-O.CaSR1, 786-O.CaSR4 und 786-O.CaSR9) eine deutliche Expression des CaSR und bei den HEK-293-transfizierten Zellen konnten zwei CaSR-überexprimierende Klone (HEK-293.CaSR1 und HEK-293.CaSR4) identifiziert werden (Abbildung 19).

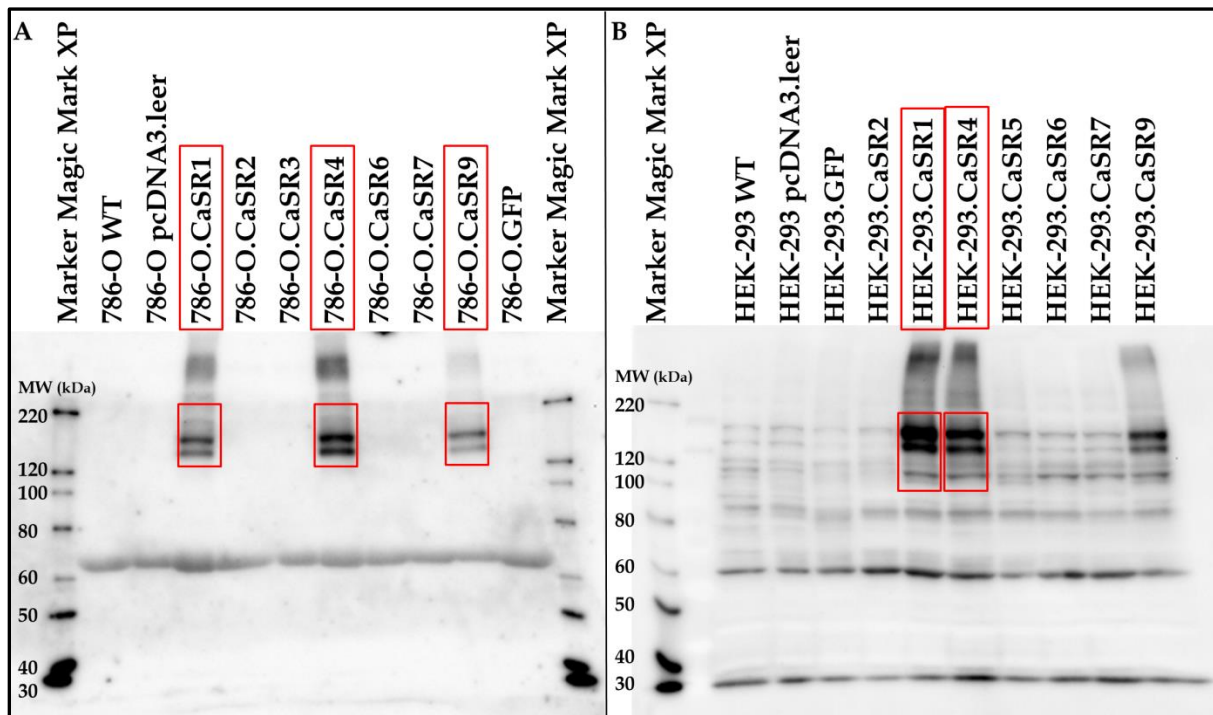


Abbildung 19: Western Blot zum Nachweis des transgenen CaSR. Als Marker diente der Molekulargewichtsstandard *Magic Mark XP*. **A.** Western Blot mit der Zelllinie 786-O samt transfizierter Klone. Die Klone 786-O.CaSR1, 786-O.CaSR4 und 786-O.CaSR9 (rote Kästchen) zeigten ein deutliches Expressionsmuster im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen und den Leervektor-transfizierten Klonen. **B.** Western Blot mit der Zelllinie HEK-293 samt transfizierter Klone. Die Klone HEK-293.CaSR1 und HEK-293.CaSR4 zeigten ein deutliches Expressionsmuster im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen und den Leervektor-transfizierten Klonen.

3.1.2.3 Durchflusszytometrische Analysen für den Nachweis des transgenen CaSR

Nachdem die Expression des CaSR in den transfizierten Zellen sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene nachgewiesen wurde, sollte die Funktionalität des exprimierten Rezeptors auf der Oberfläche der transfizierten Zellen untersucht werden. Hierfür wurden durchflusszytometrische Analysen an einem FACS-Gerät durchgeführt. Als Antikörper diente wiederum der bereits in den Western Blot-Analysen verwendete monoklonale CaSR-Antikörper der Firma *novus biologicals*, sowie eine

Isotypenkontrolle in Form eines murinen IgG-Antikörpers. Der Versuch wurde wie in Abschnitt 2.2.2.4 durchgeführt. Nach der Auswertung der Zelllinie 786-O zeigte sich, dass die Expression des CaSR bei den Klonen 786-O.CaSR1, 786-O.CaSR4 und 786-O.CaSR9 im Vergleich zu den restlichen Klonen deutlich höher lag (Abbildung 20).

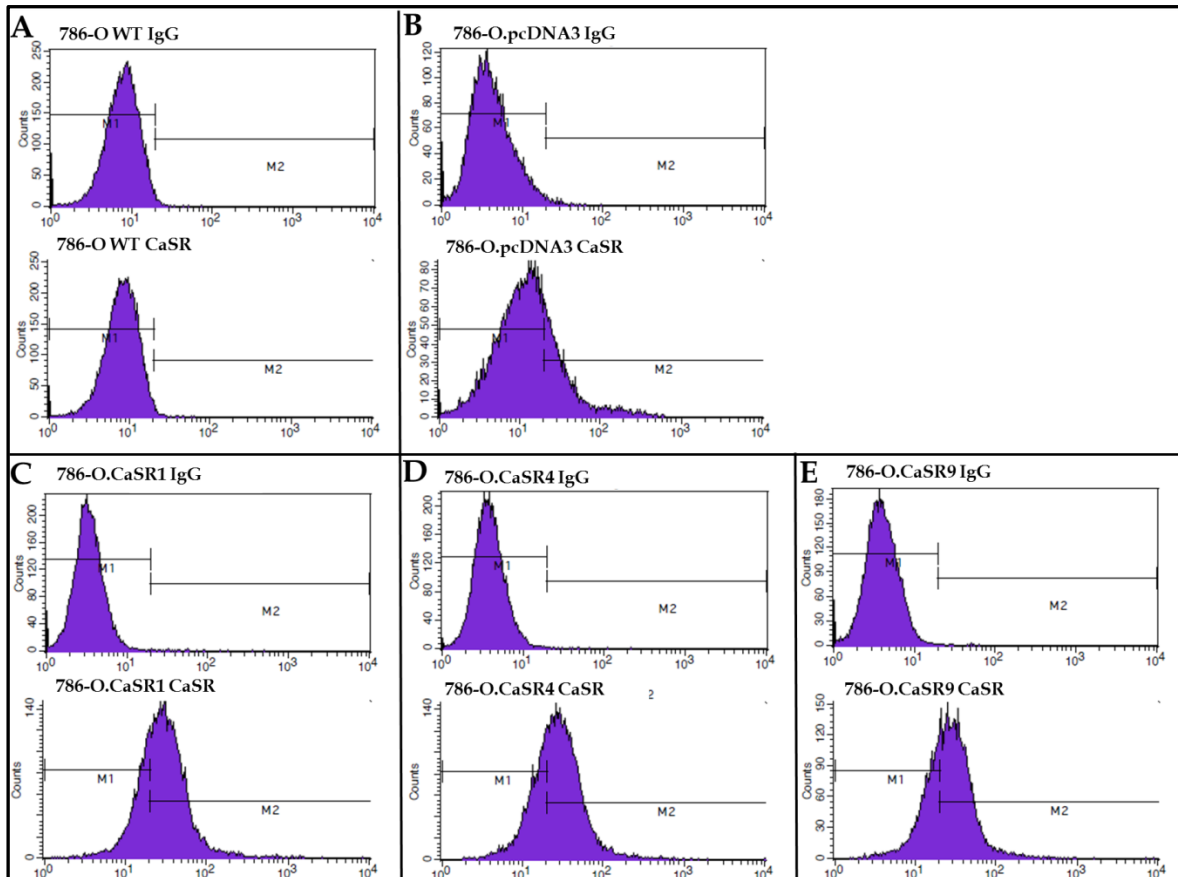


Abbildung 20: Zweidimensionale Histogramme der durchflusszytometrischen Untersuchungen der Zelllinie 786-O. Als Antikörper dienten der CaSR (unten) und eine IgG-Isotypenkontrolle (oben). **A** und **B.** Als Kontrollen des Versuches wurde die Expression des CaSR auf der Oberfläche der 786-O WT- und Leervektor-transfizierten Zellen gemessen. Hierbei konnte keine Expression des CaSR nachgewiesen werden. **C-E.** Histogramm der positiven CaSR-Klone 786-O.CaSR1, 786-O.CaSR4 und 786-O.CaSR9. Im Vergleich zu den Isotypenkontrollen zeigte sich ein deutlicher *Shift* nach rechts, der für eine starke Expression des CaSR auf den Oberflächen der transfizierten Zellen spricht.

Bei den durchflusszytometrischen Analysen der Zelllinie HEK-293 konnte für die Klone HEK-293.CaSR1 und HEK-293.CaSR4 abermals ein erhöhtes Expressionsmuster des CaSR festgestellt werden (Abbildung 21). Die weiteren positiv-selektionierten Klone zeigten keine Expression des CaSR (ohne Abbildung).

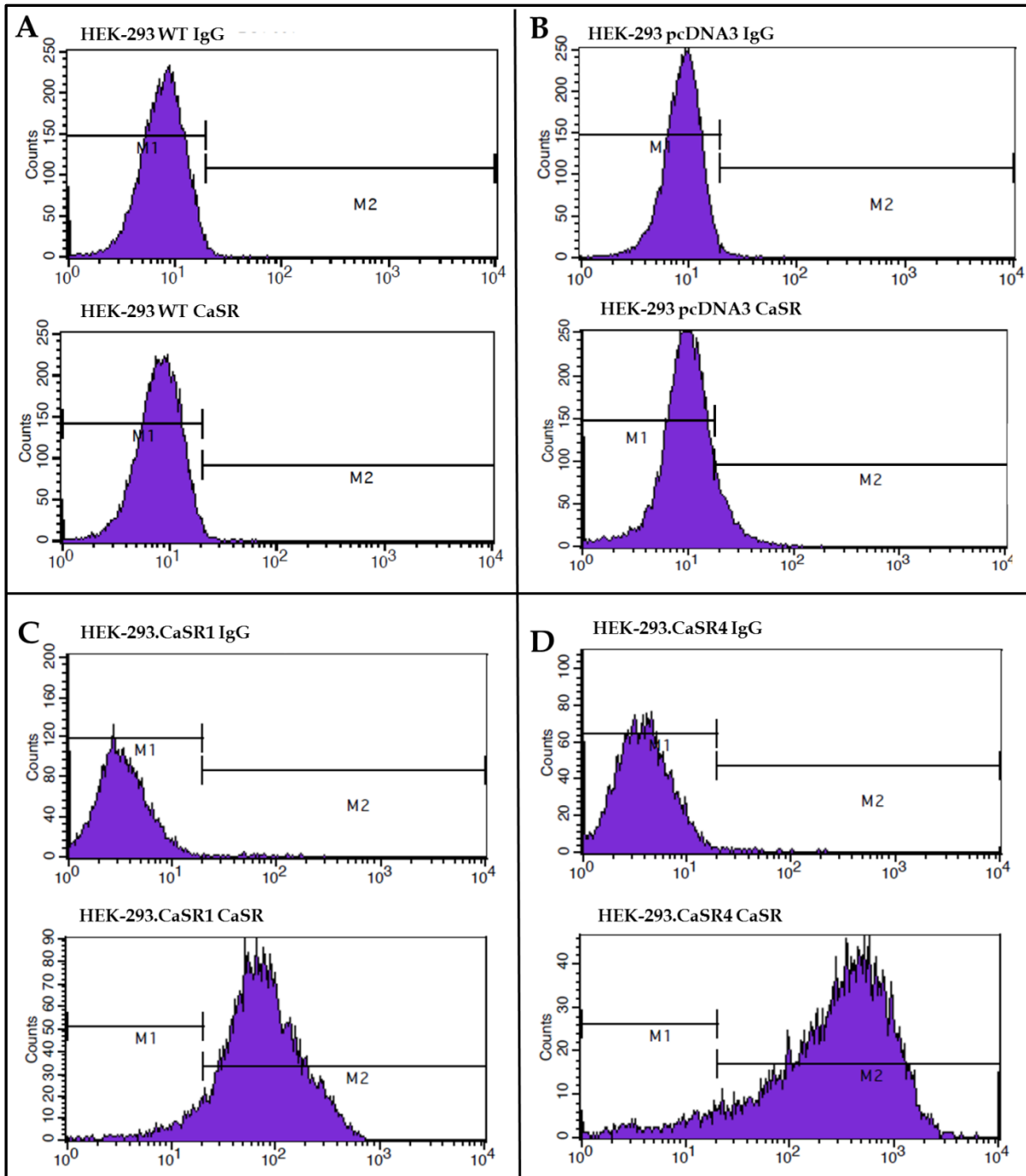


Abbildung 21: Zweidimensionale Histogramme der durchflusszytometrischen Untersuchungen der Zelllinie HEK-293. Als Antikörper dienen der CaSR (unten) und eine IgG-Isotypenkontrolle (oben). **A** und **B.** Als Kontrollen des Versuches wurde die Expression des CaSR auf der Oberfläche der HEK-293 WT- und Leervektor-transfizierten-Zellen gemessen. Hierbei konnte keine Expression des CaSR nachgewiesen werden. **C** und **D.** Histogramm der positiven CaSR-Klone HEK-293.CaSR1 und HEK-293.CaSR4. Im Vergleich zu den Isotypenkontrollen zeigte sich ein deutlicher *Shift* nach rechts, der für eine starke Expression des CaSR auf den Oberflächen der transfizierten Zellen spricht.

Aufgrund des gelungenen Nachweises der positiven CaSR-Transfektion mittels der drei verschiedenen Analyseverfahren wurden die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit den folgenden Zellen und Klonen fortgeführt:

786-O

WT

pcDNA3.Leervektor

CaSR1

CaSR4

CaSR9

HEK-293

WT

pcDNA3.Leervektor

CaSR1

CaSR4

3.2 Der Einfluss des Calcium-sensitiven Rezeptors auf die knochenspezifische Metastasierung

3.2.1 Die Auswirkungen einer erhöhten CaSR-Expression auf die Mechanismen der Metastasierung

Im folgenden Abschnitt werden die gewonnenen Ergebnisse in der Reihenfolge der Schritte einer möglichen Metastasierung dargestellt. Dabei werden zu Beginn die Schritte der Adhäsion an Komponenten der EZM sowie die Migration mit Hilfe von Chemotaxinen genauer analysiert.

3.2.1.1 Die Adhäsion an Komponenten der EZM

In der Dissoziationsphase, der ersten Phase der Metastasierung, kommt es zur Unterbrechung von Zell-Zell-Kontakten innerhalb des Primärtumors durch phänotypische Änderungen der Proteinstruktur auf den Tumorzellen. An diesen Vorgängen sind häufig Proteine der Integrin-Familie sowie Kollagene beteiligt (Alizadeh et al., 2014). Aus diesem Grund wurde die Zell-Adhäsion an 96-Well-Platten, die zuvor mit Komponenten der EZM beschichtet wurden, simuliert. Als

EZM-simulierende Bestandteile dienten in diesem Fall Fibronectin, Kollagen I und IV, sowie BSA als Kontrolle. Die Zellen wurden in die Platten gegeben, für 1 Std. inkubiert, nicht-adhärenzte Zellen abgewaschen, adhärenzte Zellen gefärbt und im Anschluss in Relation der pcDNA3 Kontrolle (=100 %) ausgewertet. Hierbei zeigte sich für die Komponenten Fibronectin und Kollagen I eine leichte Steigerung der Adhäsion bei den CaSR-exprimierenden Klonen der 786-O Zellen, die für Fibronectin in Bereichen von 30 % bis 42 % und für Kollagen I im Bereich von ~25 % lagen. In der Bindung der Zellen an Kollagen IV bewirkte eine erhöhte CaSR-Expression keine deutliche Veränderung. Bei den Klonen CaSR1 und CaSR9 kam es sogar zu einer leichten Reduktion von bis zu 20 % im Vergleich zur Leervektor-transfizierten Kontrolle. Die Auswertung der BSA-Reihe führte in den Klonen CaSR1 und CaSR9 zu einer Reduktion der Adhäsion um ~25 % (Abbildung 22). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnten bei den CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen keine Erhöhungen des Adhäsionspotentials festgestellt werden. Für die Bindung an Fibronectin bzw. Kollagen I konnten für den Klon HEK-293.CaSR1 deutliche Reduktionen in der Adhäsion festgestellt werden (~30 % - ~45 %). Zellen des Klons CaSR4 zeigten bei allen getesteten Komponenten der EZM keinen relevanten Unterschied im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 23).

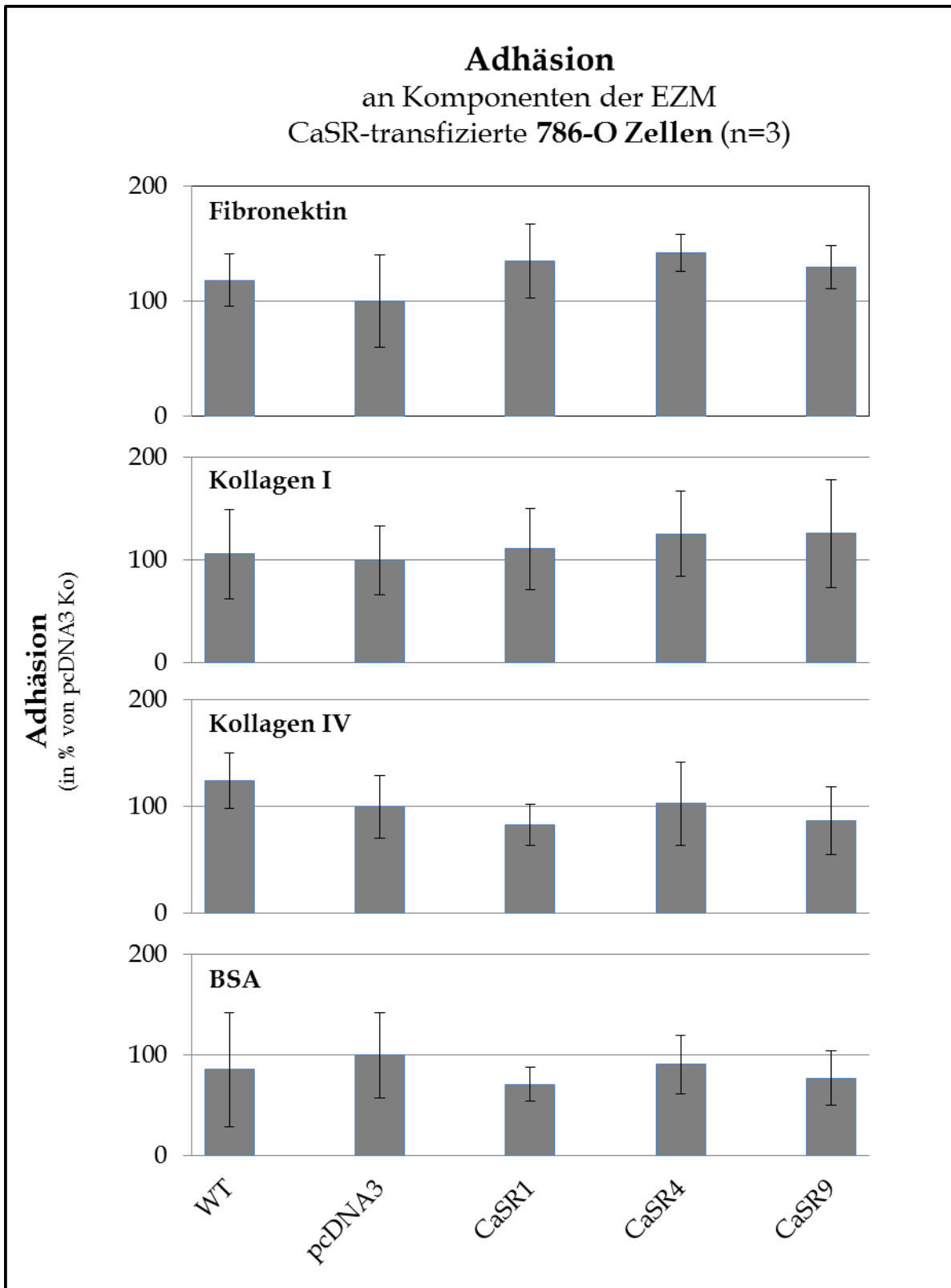


Abbildung 22: Adhäsion der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen an Komponenten der EZM (Fibronektin, Kollagen I und IV, BSA als Kontrolle (je 10 µg/ml)). Bei Verwendung von Fibronektin kam es bei allen drei CaSR-transfizierten Klonen zu einer Steigerung des adhäsiven Potentials. Eine ähnliche Tendenz konnte mit dem Einsatz von Kollagen I erzielt werden. Kollagen IV und BSA (Kontrolle) zeigten keine Adhäsionszunahme in den CaSR-exprimierenden Zellen. Hierbei kam es z.T. zu einer leichten Reduktion in der Adhäsions-Fähigkeit (CaSR1 und CaSR9). Alle Werte wurden in Relation der Leervektor-transfizierten Kontrolle (pcDNA3 Ko = 100 %) gesetzt.

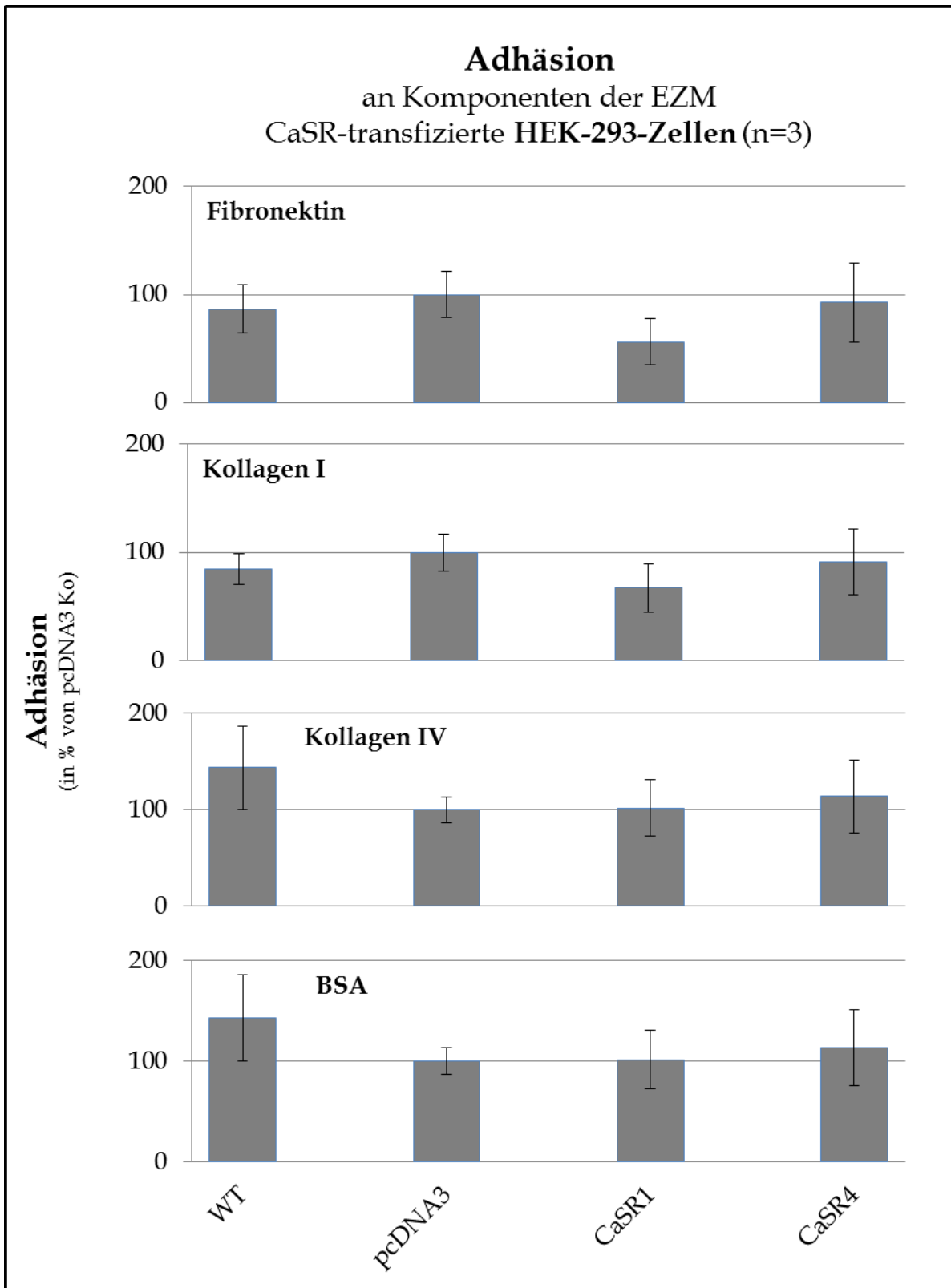


Abbildung 23: Adhäsion der CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen an Komponenten der EZM (Fibronektin, Kollagen I und IV, BSA als Kontrolle (je 10 µg/ml)). Bei Verwendung von Fibronektin und Kollagen I zeigte Klon CaSR1 eine deutliche Reduktion des Adhäsionspotentials im Vergleich zur Kontrolle. CaSR4 zeigte bei Adhäsion an jeder EZM-Komponente eine ähnlich starke Adhäsion wie die Kontrollzellen. Alle Werte wurden in Relation der Leervektor-transfizierten Kontrolle (pcDNA3 Ko = 100 %) gesetzt.

3.2.1.2 Der Einfluss des CaSR auf die chemotaktische Wirkung von Fibronectin

Die chemotaktische Migration der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen wurde unter Verwendung des EZM-Bestandteils Fibronectin als Lockstoff ermittelt. Für einen direkten Vergleich wurden WT- und Leervektor-transfizierte Zellen (pcDNA3) sowie die drei positiv-getesteten CaSR-exprimierenden Klone eingesetzt. Im Vergleich zu den Leervektor-transfizierten Zellen, zeigten die CaSR-Klone eine deutliche Steigerung des migratorischen Potentials in Richtung erhöhter Fibronectin-Konzentration, welches im Bereich von 2000 % (CaSR1) bis zu 4000 % (CaSR4) lag (Abbildung 24). Dies entsprach in Absolutwerten: pcDNA3 HM: $\bar{O}=1,24$ gewanderte Zellen; CaSR1 Fibronectin: $\bar{O}=18,96$; CaSR4 Fibronectin: $\bar{O}=49,34$; CaSR9 Fibronectin: $\bar{O}=30,62$ gewanderte Zellen (ohne Abbildung).

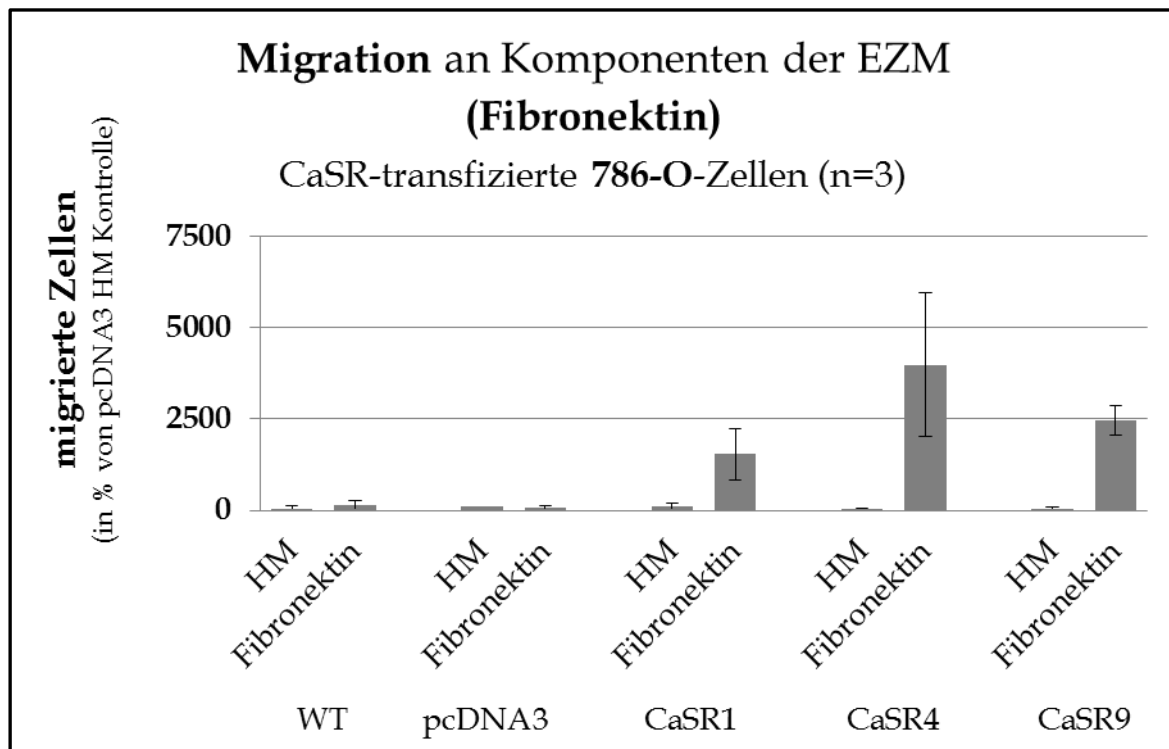


Abbildung 24: Migration der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen. Als Chemotaxin wurde Fibronectin (10 $\mu\text{g} / \text{ml}$), als Kontrolle Medium ohne Serum (HM) eingesetzt. Alle drei CaSR-transfizierten Klone zeigten bei Einsatz von Fibronectin ein deutlich stärkeres Migrationspotential als WT- oder Leervektor-transfizierte Zellen. Die Werte sind in Bezug auf die pcDNA3-HM-Kontrolle dargestellt.

Ein sehr ähnliches Bild zeigte sich bei den transfizierten HEK-293-Zellen. Während bei der Versuchsdurchführung ohne Lockstoffe keine gewanderten Zellen nachgewiesen werden konnten, zeigten sich für WT- und pcDNA3-transfizierte Zellen durch Verwendung von Fibronectin (10 µg / ml) vereinzelt gewanderte Zellen. Im Gegensatz dazu induzierte Fibronectin in CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen ein deutlich gesteigertes Migrationspotential. Bei Klon CaSR4 konnten im Durchschnitt 31 migrierte Zellen gemessen werden, bei Klon CaSR1 sogar ~48. In dieser Auswertung war es nicht möglich, das Ergebnis in Relation der Kontrollen zu setzen, da es bei den Kontrollen zu keiner Migration der Zellen kam.

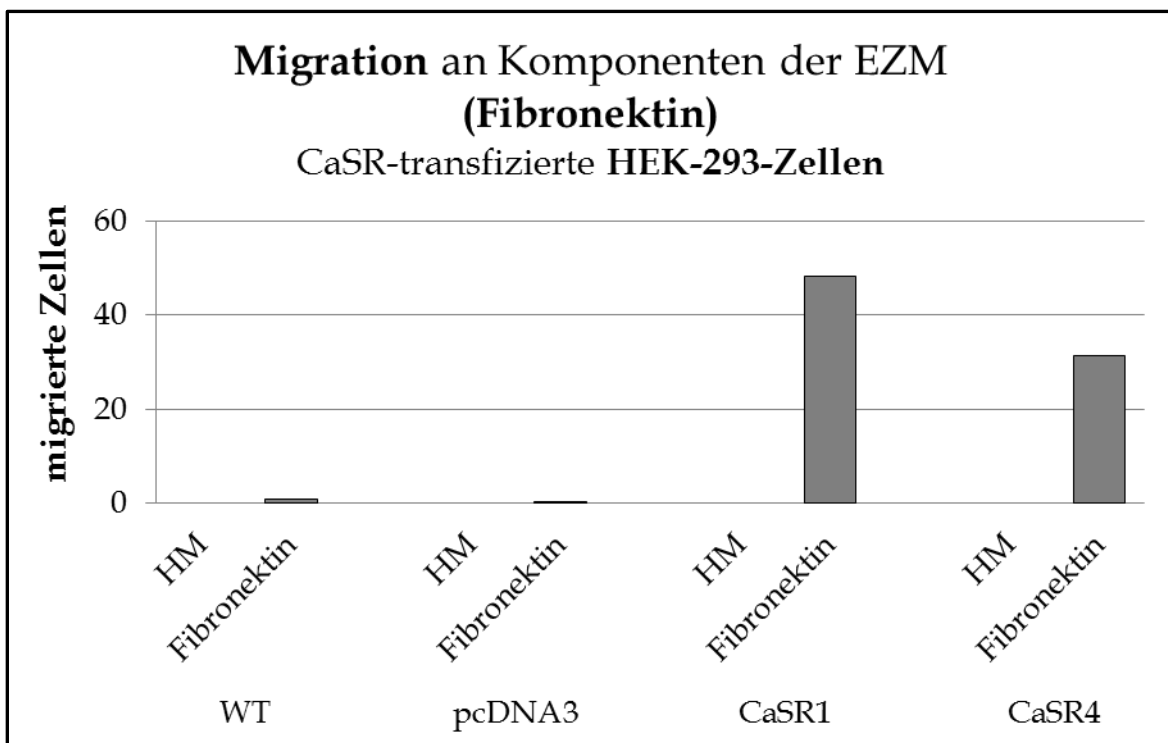


Abbildung 25: Migration der CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen. Als Lockstoff wurde Medium ohne Serum (HM) bzw. HM mit Fibronectin (10 µg / ml) eingesetzt. Während in allen eingesetzten Zellen bei Einsatz von Medium ohne Serum (HM) keine Zell-Migration stattfand, zeigten sich nach Verwendung von Fibronectin als Chemotaxin in den WT- und Leervektor-Zellen vereinzelt migrationsfähige Zellen. Bei den CaSR-exprimierenden Klonen führte der Einsatz von Fibronectin zu einer gesteigerten Migration (CaSR1 = ~31 Zellen; CaSR4 = ~48 Zellen).

3.2.1.3 Die Adhäsion am Endothel von CaSR-exprimierenden Zellen

Nach der Auswanderung der disseminierten Zellen aus dem Primärtumor und der systemischen Distribution mit Hilfe der Blut- und lymphatischen Gefäße kommt es

in feinen Kapillarstrukturen häufig zur Adhäsion am Gefäßendothel. Um diesen Vorgang in vitro zu simulieren, wurden HUVEC in 6-Well-Platten ausplattiert und bis zur Konfluenz kultiviert. Die CaSR-transfizierten 786-O-Zellen sowie dazugehörige Kontrollzellen wurden für zwei Stunden auf dem HUVEC-Monolayer inkubiert und adhärenente Zellen im Anschluss gefärbt. Hierbei zeigte sich bei den Klonen CaSR1 und CaSR4 eine leichte Steigerung (~20 %) der Adhäsion im Vergleich zu Leervektor-transfizierten Zellen, wohingegen es bei den Zellen des Klons CaSR9 zu einer deutlich stärkeren Adhäsion am Endothel (~171 %) kam (Abbildung 26).

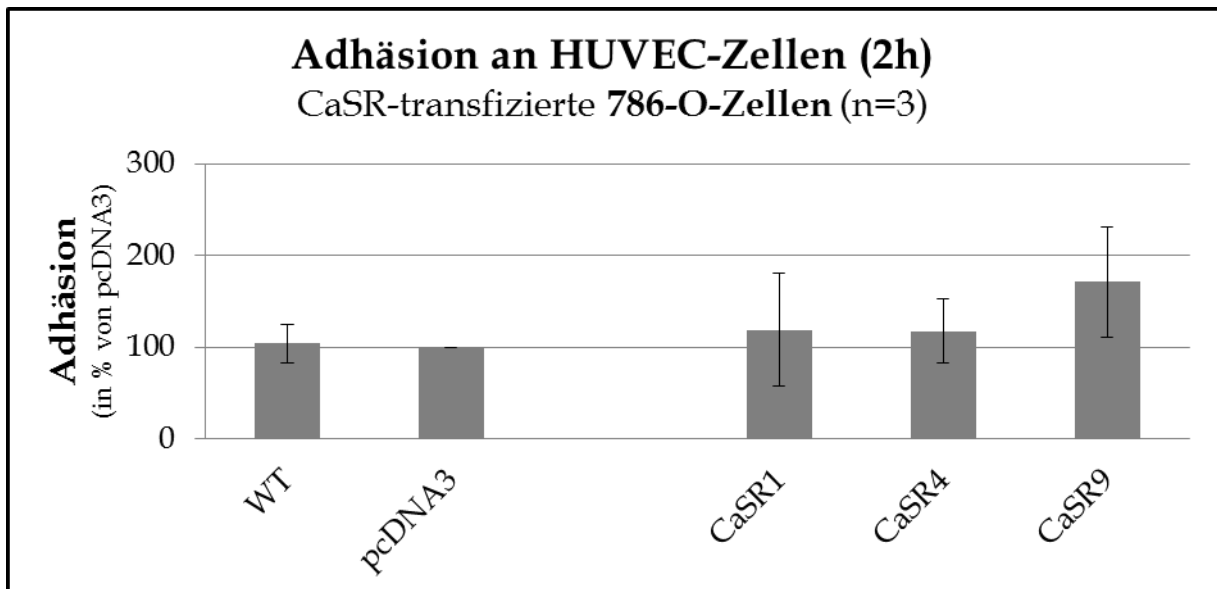


Abbildung 26: Adhäsion der transfizierten 786-O-Zellen an HUVEC. In einer 6-Well-Platte wurden HUVEC ausplattiert und kultiviert. Bei Erreichen eines dichten Monolayers wurden die CaSR-transfizierten 786-O-Zellen und Kontrollen für 2 Std. hinzugegeben. Die Klone CaSR1 und CaSR4 zeigten eine leichte Erhöhung des Adhäsionspotentials gegenüber der Kontrolle; CaSR9 ist im Vergleich dazu deutlich erhöht. Die Ergebnisse wurden in Relation zu pcDNA3 Ko gesetzt (100 %).

3.2.1.4 Der Einfluss des CaSR auf die Proliferation

Aus dem Tumor disseminierte Zellen siedeln häufig in Sekundärorganen an und bilden dort bei geeigneten Bedingungen Mikrometastasen. Damit aus einer Mikrometastase eine Makrometastase werden kann, muss sich die Zelle vermehren. Die Proliferation wurde mit Hilfe von 96-Well-Platten in vitro quantifiziert. CaSR-transfizierte 786-O-Zellen zeigten bzgl. der Proliferation keinen Unterschied zu den Kontrollzellen (Abbildung 27).

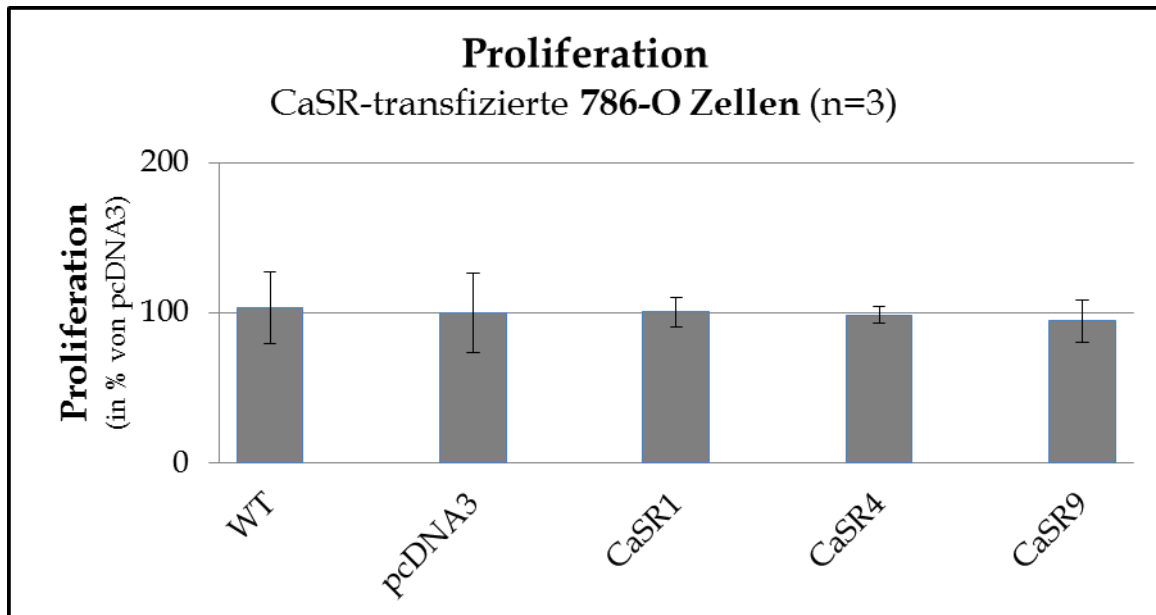


Abbildung 27: Proliferation der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen. Die transfizierten Klone zeigten keinen Unterschied in der Proliferationsstärke im Vergleich zu den Kontrollzellen WT und pcDNA3.

Bei den CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen zeigte lediglich Klon CaSR4 eine leichte Erhöhung im Proliferationsverhalten (+23 %) im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Proliferationsstärke des Klons CaSR1 war nur leicht über dem Niveau der Kontrollen (Abbildung 28).

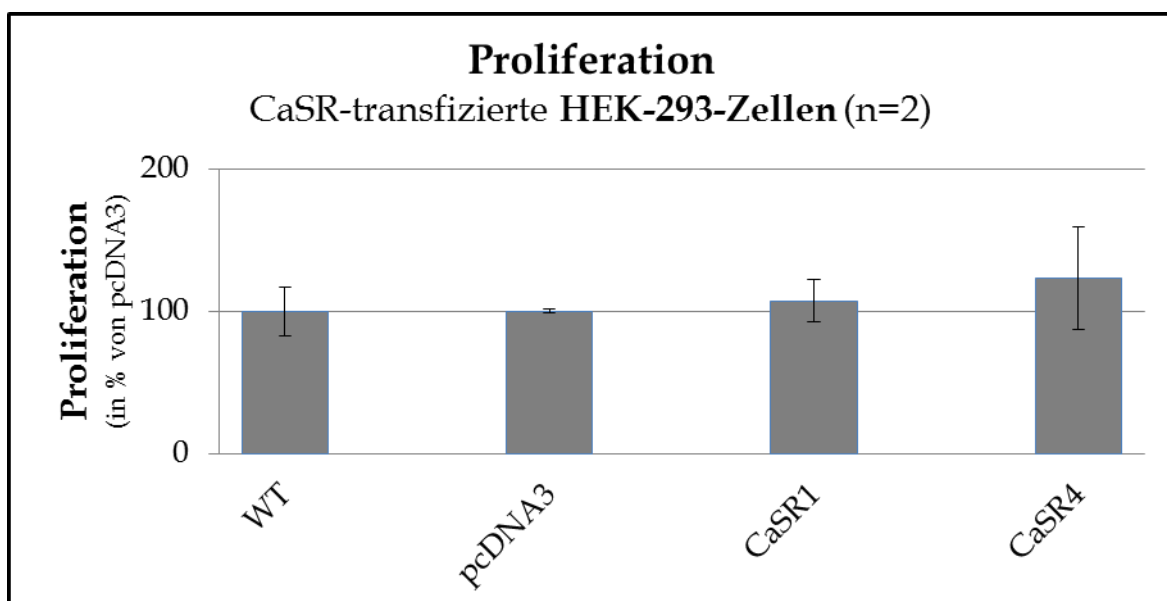


Abbildung 28: Proliferation der CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen. Im Vergleich zu den Leervektor-kontrollen konnte im Klon CaSR4 eine leicht erhöhte Proliferation festgestellt werden. Klon CaSR4 zeigte ein Proliferationsniveau ähnlich der Kontrolle.

3.2.2 Die Auswirkungen einer Behandlung mit Calcium auf CaSR-transfizierte Zellen

Eine der Hauptaufgaben des CaSR ist die Regulation der Calcium-Homöostase in verschiedenen Kompartimenten des Körpers. Hierbei werden extrazelluläre Calcium-Level durch den Rezeptor detektiert und durch Freisetzung von Hormonen wie PTH ausgeglichen (Chen et al., 2004). Des Weiteren ist Calcium ein Hauptbestandteil des Knochens und wird bei Auf- und Abbauprozessen in Ionenform freigesetzt (Clarke, 2008). Ob und wie stark Calcium auf die CaSR-transfizierten Zellen und damit auch auf die verschiedenen Vorgänge - wie Zellproliferation, -adhäsion und -migration - einwirkt, sollte mit Hilfe verschiedener Analysemethoden nachgewiesen werden. Zudem wurden im gleichen Ansatz die CaSR-transfizierten Zellen mit einer Kombination zum einen aus CaSR-Inhibitor NPS2143 + Calcium, und zum anderen aus CaSR-Aktivator Cinacalcet + Calcium behandelt.

3.2.2.1 Bestimmung der optimalen Behandlungskonzentration für NPS2143 und Cinacalcet

Für die in den nachfolgenden Versuchen eingesetzten Behandlungen mussten im Vorfeld die optimalen Konzentrationen ermittelt werden. Hierfür wurden Vitalitäts-Assays (MTT-Test) mit verschiedenen Konzentrationen des CaSR-Inhibitors NPS2143 und des CaSR Aktivators Cinacalcet an WT-Zellen der Zelllinien 786-O und HEK-293 durchgeführt. Als optimaler Wert stellte sich sowohl für NPS2143 als auch für Cinacalcet eine Konzentration von 10 μ M heraus. Die Vitalität der Zellen bei dieser Konzentration lag nur sehr leicht unter dem Niveau der Kontrollzellen. Die nächsthöhere Konzentration (20 μ M) führte allerdings schon zu deutlichen Reduktionen der Zellvitalität (Abbildung 29 und Abbildung 30).

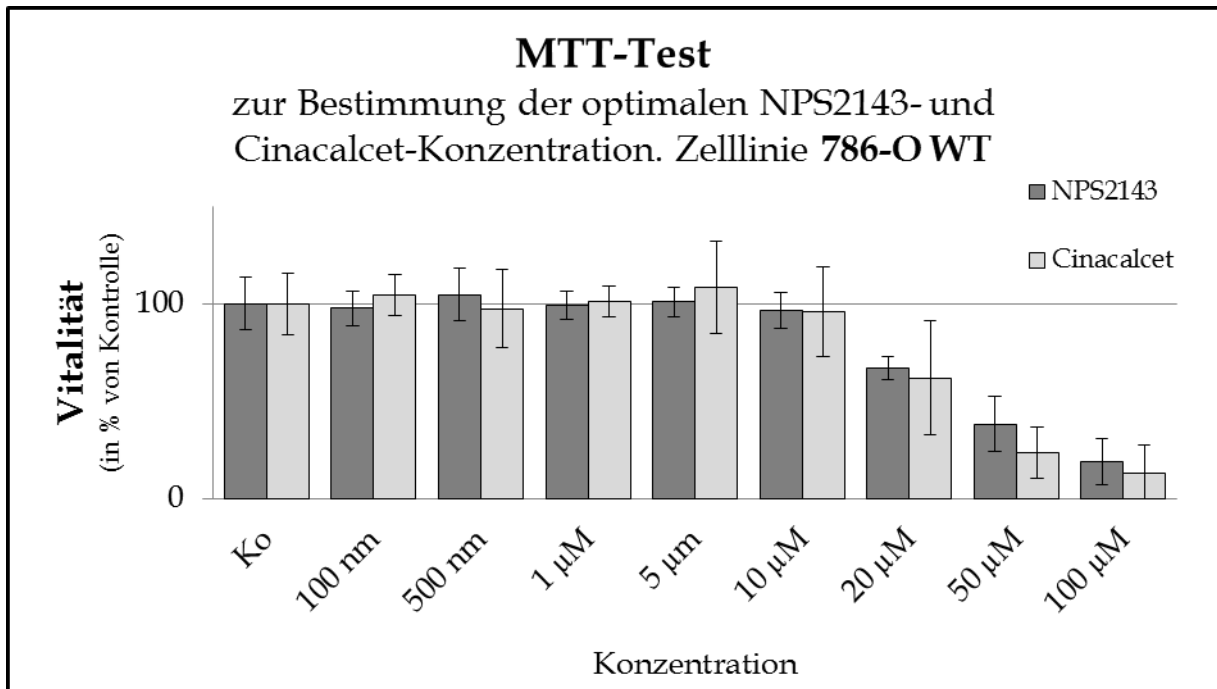


Abbildung 29: Vitalitätstest (MTT) der Zelllinie 786-O WT zur Bestimmung der optimalen Behandlungskonzentration der Substanzen NPS2143 und Cinacalcet. Es stellte sich sowohl für NPS2143 als auch für Cinacalcet die Konzentration von 10 µM als optimal heraus. Die Werte wurden jeweils in Relation der unbehandelten Kontrollen (Ko = 100 %) gesetzt.

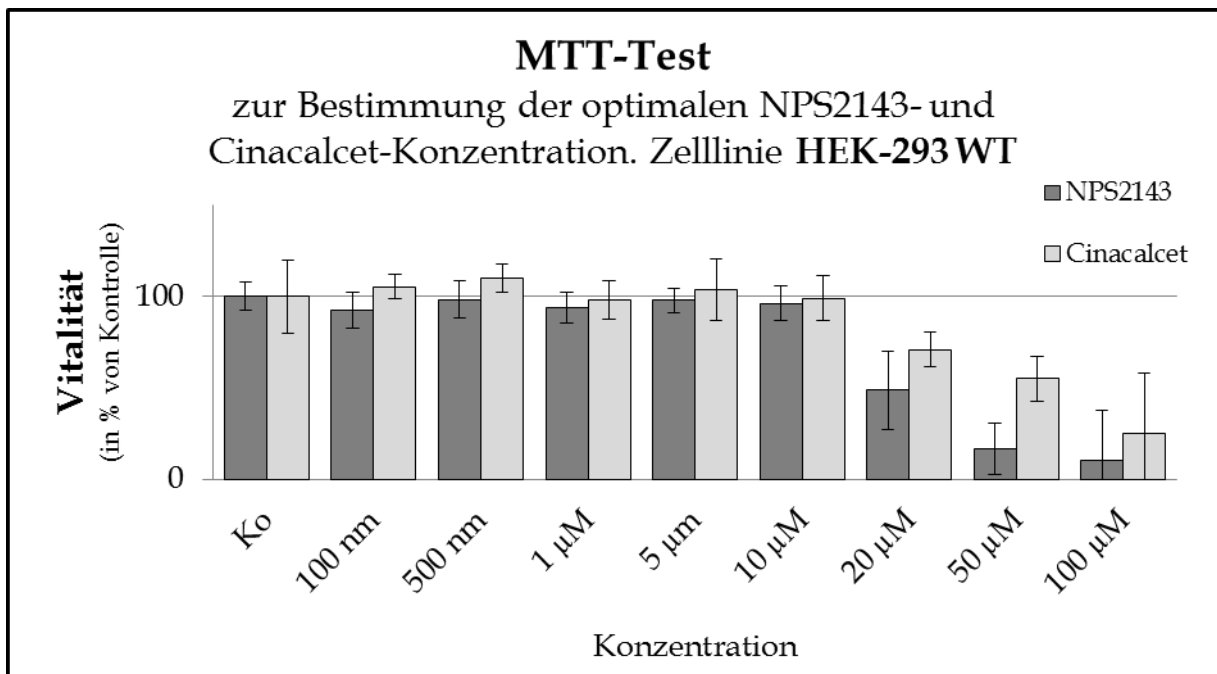


Abbildung 30: Vitalitätstest (MTT) der Zelllinie HEK-293 WT zur Bestimmung der optimalen Behandlungskonzentration der Substanzen NPS2143 und Cinacalcet. Nach Auswertung des MTT-Tests stellte sich sowohl für NPS2143 als auch für Cinacalcet die Konzentration von 10 µM als optimal heraus. Die Werte wurden jeweils in Relation der unbehandelten Kontrollen (Ko = 100 %) gesetzt.

3.2.2.2 Calcium beeinflusst die Adhäsion von CaSR-transfizierten Zellen an Bestandteilen der EZM

Die Adhäsion der CaSR-transfizierten Nierenzellen an Komponenten der EZM wurde unter dem Einfluss von Calcium, bzw. mit Kombinationen aus Aktivator oder Inhibitor bestimmt. Zur Auswertung wurden alle Werte in Bezug zur jeweiligen unbehandelten, Leervektor-transfizierten Kontrolle (pcDNA3 = 100 %) gesetzt. Alle Experimente wurden dreifach durchgeführt.

3.2.2.2.1 Die Adhäsion der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen an Komponenten der EZM

Bei der Adhäsion der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen an Fibronectin zeigten alle drei CaSR-exprimierenden Klone (CaSR1, CaSR4 und CaSR9) eine deutliche Steigerung der Adhäsion nach Calcium-Behandlung (10 mM). Bei CaSR1 und CaSR9 konnte ein Adhäsionszuwachs von etwa 150 % gemessen werden, bei CaSR4 sogar ~190 %. Die Kombinationsbehandlung aus dem CaSR-Inhibitor NPS2143 (10 µM - 1 Std.) und Calcium (10 mM - 30 Min.) senkte hingegen das Adhäsionsniveau wieder deutlich ab: Während beim Klon CaSR trotz NPS2143-Behandlung das Adhäsionspotential noch etwa 30 % über Kontrollniveau lag, näherte es sich bei den zwei übrigen Klonen dem Kontrollwert an. Die Kombinationsbehandlung aus CaSR-Aktivator Cinacalcet (10 µM - 1 Std.) und Calcium (10 mM - 30 Min.) führte wieder zu einer starken Adhäsion der CaSR-transfizierten Zellen, die bei allen drei Klonen allerdings knapp unter dem Niveau der Behandlung mit Calcium lag. Die Behandlung der WT- (ohne Abbildung) und der Leervektor-transfizierten Zellen hingegen beeinflusste die Adhäsion an Fibronectin kaum (Abbildung 31).

Die Adhäsion an Kollagen I zeigte eine ähnliche Tendenz wie die an Fibronectin. Durch die Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min.) kam es zu einer deutlichen Steigerung der Adhäsion der Klone CaSR1, CaSR4 und CaSR9. Hierbei konnten dreimal so starke Werte, wie bei der Adhäsion der Kontrollzellen gemessen werden, mit dem Maximum bei CaSR4 und 340 % Adhäsionssteigerung. Dieser Effekt konnte ebenfalls durch die Kombinationsbehandlung aus NPS2143 und Calcium umgekehrt

werden, lag aber bei allen drei Klonen noch deutlich über dem gemessenen Wert der unbehandelten Kontrollen (~130 % - ~170 %). Nach Kombinationsbehandlung mit Cinacalcet und Calcium wurde ein deutlicher Zuwachs der Adhäsion gemessen. Diese Werte lagen jedoch unter jenen aus der Einzelbehandlung mit Calcium. Wie auch bei der Adhäsion an Fibronectin hatte die Behandlung der WT- (ohne Abbildung) und Leervektor-transfizierten Zellen keine Auswirkung auf die Adhäsion (Abbildung 31).

Die Verwendung von Kollagen IV für die Adhäsion an EZM-Bestandteilen zeigte bei CaSR-transfizierten 786-O-Zellen nach jedweder Behandlung nur geringfügige bis keine Effekte auf das Adhäsionspotential. Die Behandlung der Wildtyp- (ohne Abbildung) und Leervektor-transfizierten Zellen brachte ebenfalls keinen merklichen Unterschied im Adhäsionspotential (Abbildung 32).

Bei der Verwendung von BSA zur Kontrolle der Adhäsion konnten für die Klone CaSR1 und CaSR9 ohne wie auch bei jedweder Behandlung leichte Rückgänge des Adhäsionspotentials gemessen werden. Die Zellen des Klons CaSR4 zeigten kein Ansprechen auf alle Behandlungen. Wildtyp- (ohne Abbildung) und Leervektor-transfizierte Zellen wurden durch die Behandlungen nicht beeinflusst (Abbildung 32).

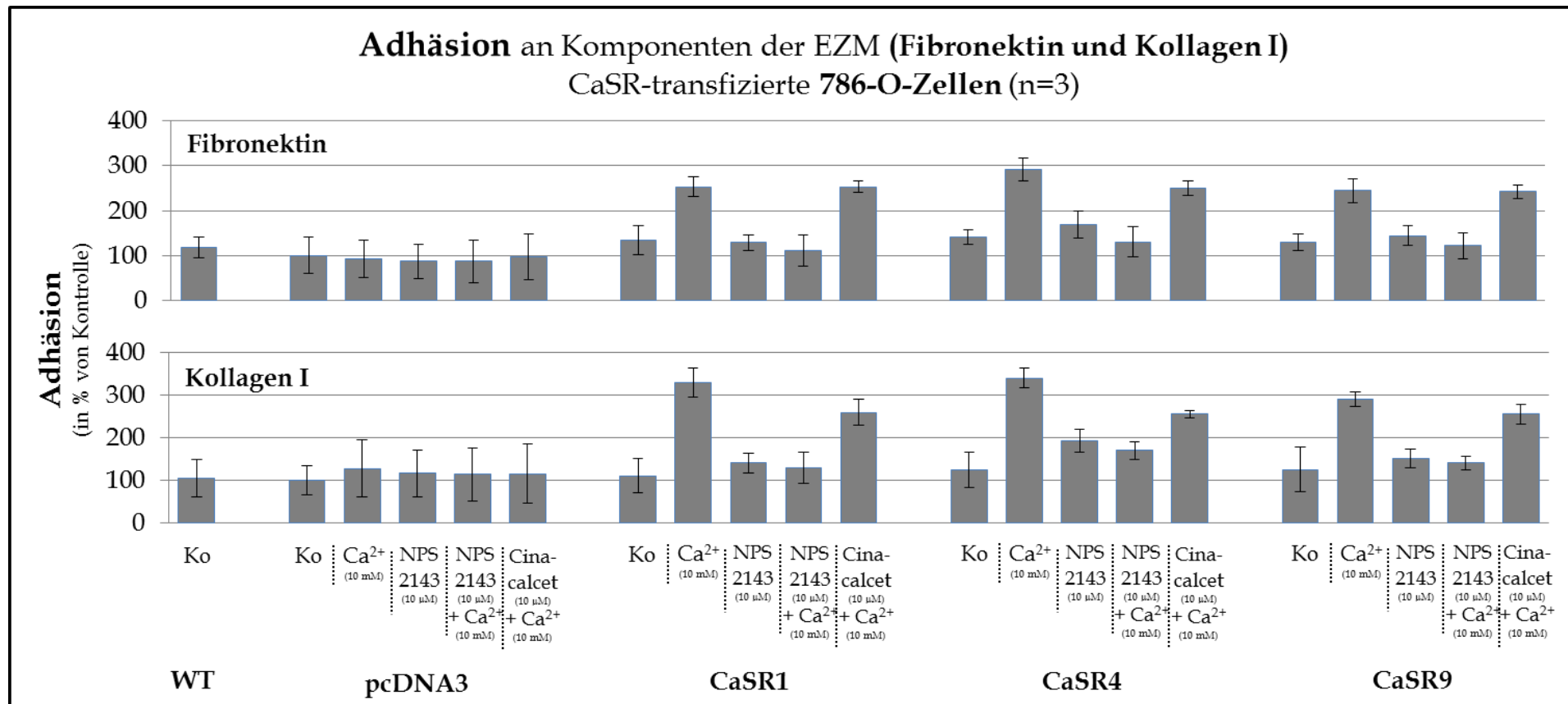


Abbildung 31: Adhäsion der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen an Fibronektin und Kollagen I nach Behandlung mit Calcium (10 mM – 30 Min), NPS2143 (10 μM – 1 Std.), Cinalcet (10 μM – 1 Std.) oder Kombinationen daraus. Die drei CaSR-positiven Klone CaSR1, CaSR4 und CaSR9 zeigten nach Behandlung mit Calcium (10 mM) eine deutlich gesteigerte Adhäsion an Fibronektin, die annähernd dreifach so stark war (250 % - ~300 %) wie bei den Kontrollzellen (pcDNA3 Ko). Bei allen drei Klonen konnte dieser Effekt durch eine einstündige Behandlung mit NPS2143 (10 μM) umgekehrt werden, sodass die Adhäsion auf Kontrollniveau sank. Eine im Vorfeld durchgeführte Behandlung mit Cinalcet (10 μM) zeigte in Bezug auf Fibronektin, die gleiche Intensität der Adhäsion wie die lediglich mit Calcium-behandelten Zellen. Ein noch deutlicheres Bild bot sich bei Durchführung des Adhäsionsversuchs an Kollagen I. Hier lag die Intensität der Adhäsion bei allen drei CaSR-positiven Klonen bei ~300 % und mehr im Vergleich zu den Kontrollzellen. Ebenfalls führte die Behandlung mit NPS2143 zu einer Umkehr des Effekts, erreichte aber nicht ganz das Kontrollniveau. Die Adhäsion an Kollagen I nach Dualbehandlung mit Cinalcet und Calcium führte zu Werten bis zu 250 % des Kontrollwerts, reichte aber nicht an die Werte der einfachen Calcium-behandlung heran. Sämtliche Behandlungen der Zellen zeigten keinen Einfluss auf die Adhäsionsstärke der Kontrollzellen des WT bzw. der Leervektor-transfizierten Zellen. Alle Werte wurden in Relation zu pcDNA3 Ko gesetzt (=100 %).

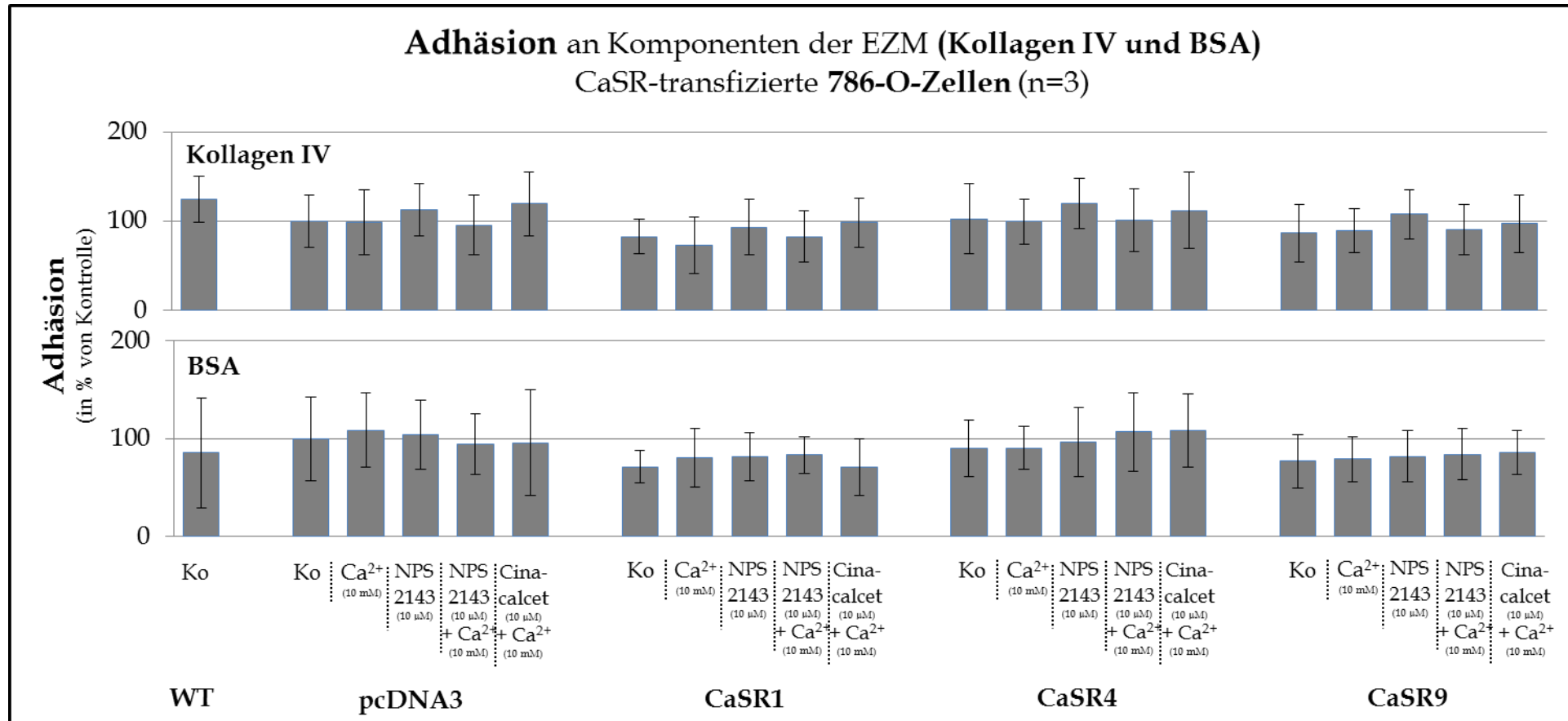


Abbildung 32: Adhäsion der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen an Kollagen IV und BSA nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min), NPS2143 (10 μM - 1 Std.), Cinalcet (10 μM - 1 Std.) oder Kombinationen daraus. Bei den Adhäsionsversuchen an Kollagen IV wurde mit keiner durchgeführten Behandlung eine Änderung des Adhäsionsvermögens, weder bei den WT-Zellen, noch bei den CaSR-positiven Klonen beobachtet. Das gleiche Bild bot sich bei der Adhäsion an BSA. Hierbei zeigten sich kleine Schwankungen in der Adhäsion bei CaSR1 und CaSR9 Klonen durchweg bei jeder Behandlung. Alle Werte wurden in Relation zu pcDNA3 Ko gesetzt (=100 %).

3.2.2.2 Die Adhäsion der CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen an Komponenten der EZM

Die Adhäsion der CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen an Fibronectin zeigte für beide CaSR-exprimierenden Klone (CaSR1 und CaSR4) eine Steigerung nach Calcium-Behandlung (10 mM) um 60 %, verglichen mit den unbehandelten Kontrollzellen (pcDNA3 Ko). Die Kombinationsbehandlung aus NPS2143 (10 µM - 1 Std.) und Calcium führte bei den Zellen des Klons CaSR1 zu einer Absenkung der Adhäsionsrate deutlich unter Niveau der Kontrollzellen (-34 %). Auch bei Klon CaSR4 führte die Kombinationsbehandlung zu einem Absinken der Adhäsionsfähigkeit, die sich jedoch auf dem Wert der Kontrolle einpendelte. Die Behandlung mit Cinacalcet (10 µM - 1 Std.) und Calcium (10 mM - 30 Min.) führte wieder zu einem deutlichen Anstieg der Adhäsionsfähigkeit der Klone CaSR1 und CaSR9. Bei beiden kam es zu einer leichten Steigerung des Adhäsionspotentials im Vergleich zu den ausschließlich mit Calcium-behandelten Zellen (Abbildung 33).

Die Adhäsion der CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen an Kollagen I war nach Behandlung mit Inhibitor, Aktivator und/oder Calcium unverändert. Die WT- (ohne Abbildung) und Leervektor-transfizierten Zellen zeigten ebenfalls nach Behandlung keine Änderungen im Adhäsionsvermögen (Abbildung 33).

Die Verwendung von Kollagen IV zur Adhäsion von CaSR-exprimierenden HEK-293-Zellen führte bei Klon CaSR1 nach Behandlung von Calcium (10 mM - 30 Min.) zu einer Steigerung der Adhäsion um fast 44 %. Allerdings wurden in dieser Reihe auch bei den unbehandelten WT, sowie der kompletten Behandlungsreihe der Leervektor-transfizierten HEK-293-Zellen Adhäsionssteigerungen von etwa 40 % beobachtet. Des Weiteren wurde eine annähernd 40 %-ige Steigerung in der Adhäsion der Zellen des Klons CaSR4 nach Kombinationsbehandlung aus Cinacalcet und Calcium gemessen. Die weiteren Behandlungen hatten keine Auswirkungen auf die CaSR-transfizierten Klone (Abbildung 34).

Die Adhäsion unter BSA-Einfluss zeigte in den Kontrollzellen das mit Abstand stärkste Potential. Alle anderen gemessenen Werte lagen ca. 20 % - 40 % unter diesem Niveau (Abbildung 34).

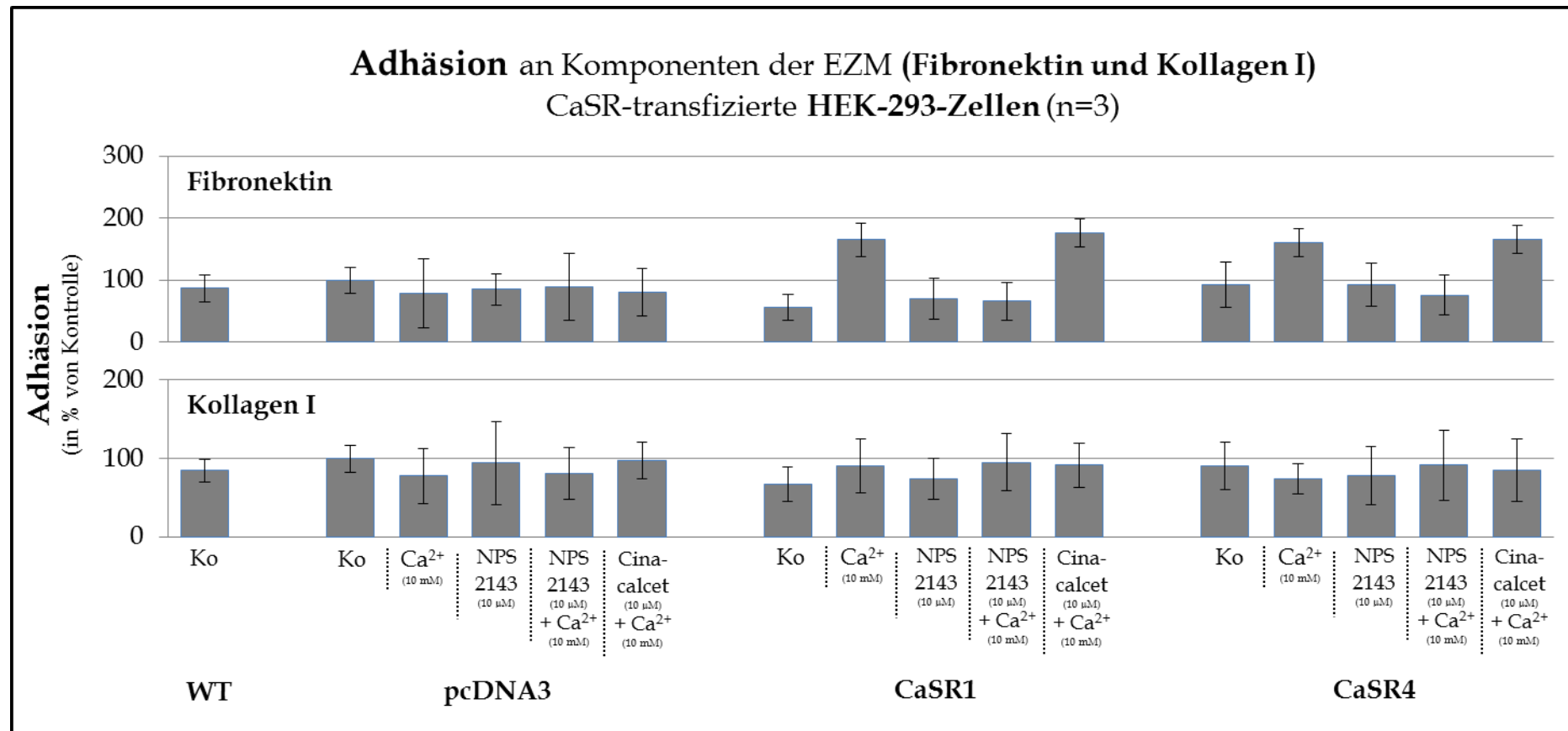


Abbildung 33: Adhäsion der CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen an Fibronektin und Kollagen I nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min), NPS2143 (10 μM - 1 Std.), Cinacalcet (10 μM - 1 Std.) oder Kombinationen daraus. Die zwei CaSR-positiven Klone CaSR1 und CaSR4 zeigten nach Behandlung mit Calcium (10 mM) eine gesteigerte Adhäsion an Fibronektin, die über das 1,5-fache des Kontrollniveaus hinausging (~165 %). Dieser Effekt konnte bei beiden positiven Klonen durch eine einstündige Behandlung mit NPS2143 umgekehrt werden. Eine kombinierte Behandlung mit Cinacalcet und Calcium führte zu einer ähnlich starken Adhäsion der Klone CaSR1 und CaSR4 an Fibronektin, wie bereits bei der einfachen Behandlung mit Calcium. Die Ergebnisse der Kollagen I-Versuche hingegen zeigten weder in den Kontrollzellen (pcDNA3 und WT), noch in den positiven Klonen eine Auswirkung auf das Adhäsionsvermögen. Alle gemessenen Werte lagen im Bereich der pcDNA3 Kontrolle bzw. leicht darunter. Die gemessenen Werte wurden in Relation zu pcDNA3 Ko (=100 %) gesetzt.

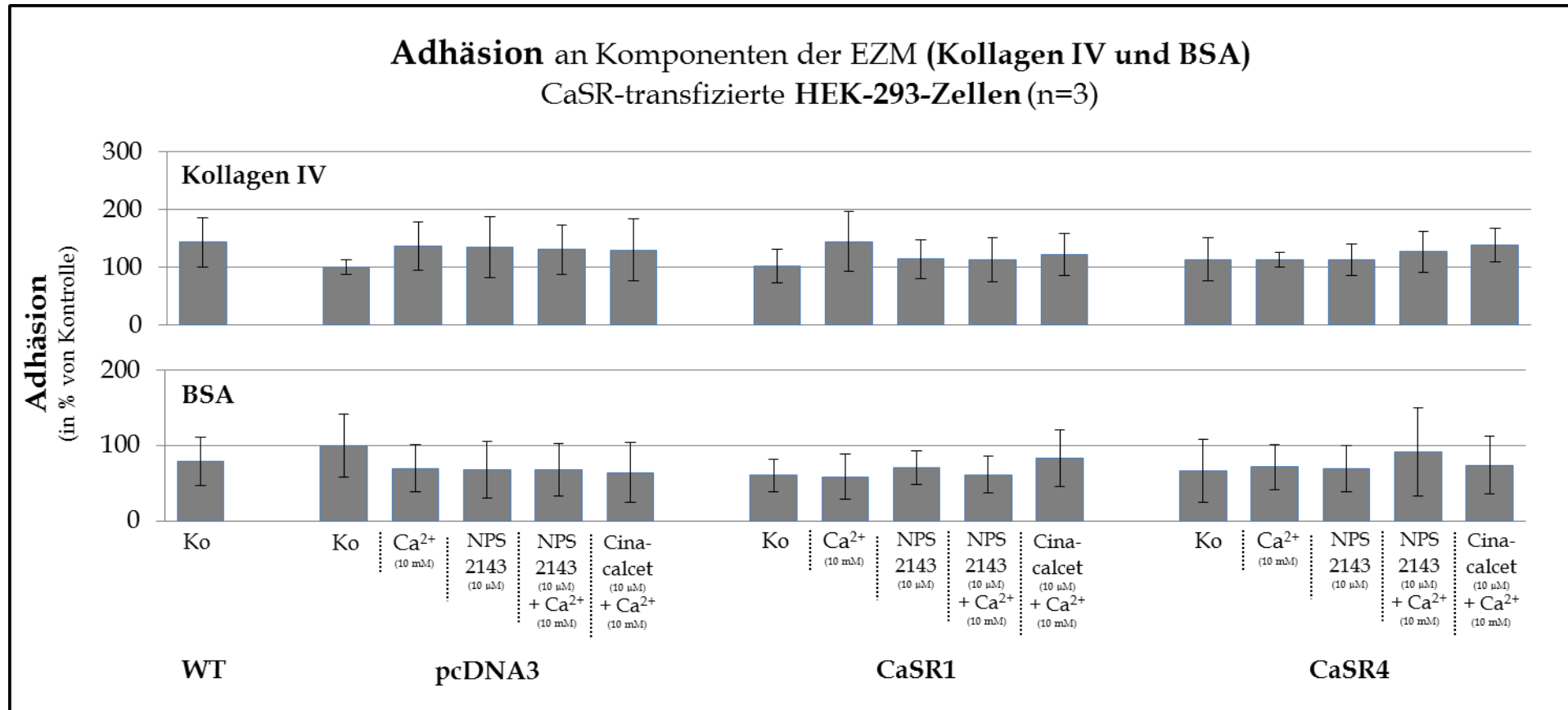


Abbildung 34: Adhäsion der CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen an Kollagen IV und BSA nach Behandlung mit Calcium (10 mM – 30 Min), NPS2143 (10 μM – 1 Std.), Cinalcet (10 μM – 1 Std.) oder Kombinationen daraus. Bei der Adhäsion an Kollagen IV kam es lediglich im Klon CaSR1 nach Behandlung mit Calcium zu einer leichten Steigerung der Adhäsion. Da sich der Messwert auf einem ähnlichen Niveau wie in den Kontrollzellen befand, war dieser zu vernachlässigen. Insgesamt lagen alle übrigen Änderungen im Bereich von etwa 20 % und unterliegen messbedingten Schwankungen. Die Auswertung der Adhäsion der HEK-293-Zellen an BSA zeigte ein Adhäsionsmaximum bei den Kontrollzellen (pcDNA3 Ko), bzw. lagen alle weiteren gemessenen Werte z.T. deutlich darunter (20 % - 40 %). Die Werte wurden in Relation zu der Leervektor-transfizierten Kontrolle (pcDNA3 Ko) gesetzt.

3.2.2.3 Calcium beeinträchtigt die Migration der CaSR-transfizierten Zellen

Um das Auswandern der Nierenkarzinomzellen in Richtung erhöhter Calcium-Konzentration, wie sie im Knochen auftritt, zu simulieren, wurden mit den CaSR-transfizierten 786-O-Zellen Migrationsanalysen durchgeführt. Hierfür wurden neben den nicht-transfizierten Wildtyp-Zellen die Leervektor-transfizierten sowie die drei CaSR-transfizierten Klone eingesetzt. Neben den unbehandelten Kontrollen wurden die Zellen zu Beginn des Versuchs einer Behandlung unterzogen; entweder einer einstündigen Behandlung mit dem CaSR-Inhibitor NPS2143 (10 μ M) oder mit dem CaSR-Aktivator Cinacalcet (10 μ M). Als Chemotaxin fungierte serumfreies Medium mit Calcium (10 mM), als Kontrolle lediglich serumfreies Medium (HM). Die Migration wurde nach 16 Std. Inkubation abgestoppt und gewanderte Zellen mit Hilfe einer Zell-Färbung visualisiert (siehe Abschnitt 2.2.2.10). Zur Auswertung wurden alle Ergebnisse in Relation zu Leervektor-transfizierten Zellen ohne Behandlung (pcDNA3 Ko = 100 %) gesetzt. Im Vergleich zu WT- als auch zu den Leervektor-transfizierten Zellen zeigten alle drei CaSR-exprimierenden Klone ein starkes Migrationspotential bei Verwendung von Calcium als Lockstoff. Hierbei konnten Steigerungen auf ~3000 % (CaSR1) bis 5000 % (CaSR9) im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden. Durch eine zusätzliche Behandlung mit NPS2143 konnte dieser Effekt in allen CaSR-positiven Klonen wieder umgekehrt werden. Die Behandlung mit 10 μ M Cinacalcet, welches einen Aktivator des CaSR darstellt, zeigte bei den Zellen der CaSR1- und CaSR9-Klone eine eher inhibitorische Wirkung auf die Migration. Lediglich die Klone CaSR4 der transfizierten 786-O-Zellen zeigten nach einstündiger Behandlung mit dem Aktivator Cinacalcet ähnlich hohe Migrationslevel, wie das unbehandelte Pendant. Sowohl in den wildtypischen als auch in den Leervektor-transfizierten Zellen zeigte die Verwendung von Calcium als Chemotaxin keinerlei Einfluss auf die Migration. So hatten auch die Behandlungen mit NPS2143 bzw. Cinacalcet keinerlei Auswirkung auf die Migration der Zellen (Abbildung 35).

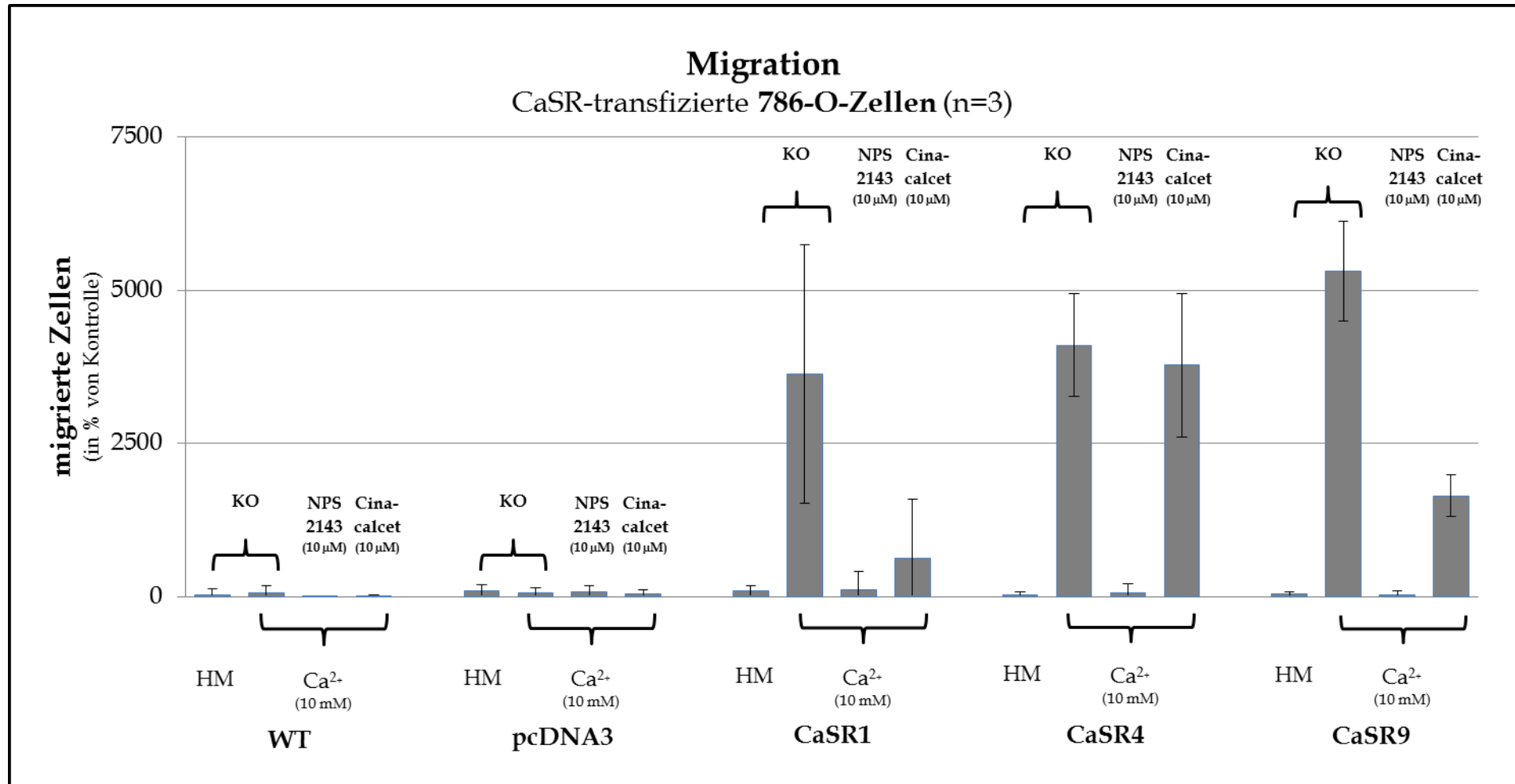


Abbildung 35: Migration der CaSR-transfizierten 786-O Zellen mit Hilfe des Lockstoffs Calcium (10 mM) nach Behandlung mit NPS2143 (10 μM - 1 Std.) oder Cinacalcet (10 μM - 1 Std.). Die Lockstoffe sind unter dem Diagramm beschrieben, während die Behandlung der Zellen vor Migrationsbeginn über dem Balken verzeichnet wurde. Die Werte sind in Relation der pcDNA3 HM-Kontrolle dargestellt. In den unbehandelten Kontrollen der CaSR-transfizierten Zellen konnte mit Hilfe des Lockstoffs Ca²⁺ eine deutliche Steigerung des Migrationspotentials beobachtet werden. Der Effekt wurde durch eine einstündige Behandlung mit NPS2143 aufgehoben. Eine einstündige Behandlung der Zellen mit Cinacalcet zeigte keinen nennenswerten Effekt auf die transfizierten Zellen.

3.2.2.4 Calcium steigert die Adhäsion CaSR-transfizierter Zellen an Endothelzellen

Um die Auswirkungen einer Calcium-Behandlung auf das Adhäsionsverhalten der CaSR-exprimierenden Zellen an Endothel zu untersuchen, wurden erneut 6-Well-Platten mit einem HUVEC-Monolayer besiedelt. Die transfizierten Zellen wurden zwei Stunden auf diesem inkubiert und adhärenzte Zellen im Anschluss ausgezählt. Dabei zeigte sich, dass eine Behandlung mit Calcium bzw. NPS2143 und Calcium zu keiner Auswirkung auf das Adhäsionsverhalten der WT- oder Leervektor-transfizierten Zellen führte. Im Gegensatz dazu führte die vorab durchgeführte Behandlung mit Calcium (10 mM) zu einer deutlichen Steigerung der Adhäsion in allen drei CaSR-exprimierenden Klonen. Die Steigerung lag zwischen 530 % (CaSR1) und 710 % (CaSR9). Durch die zusätzliche Behandlung mit NPS2143 wurde dieser Effekt wieder umgekehrt (Abbildung 36). Alle Werte wurden in Relation zu den Leervektor-transfizierten Kontrollen (pcDNA3 Ko = 100 %) gesetzt.

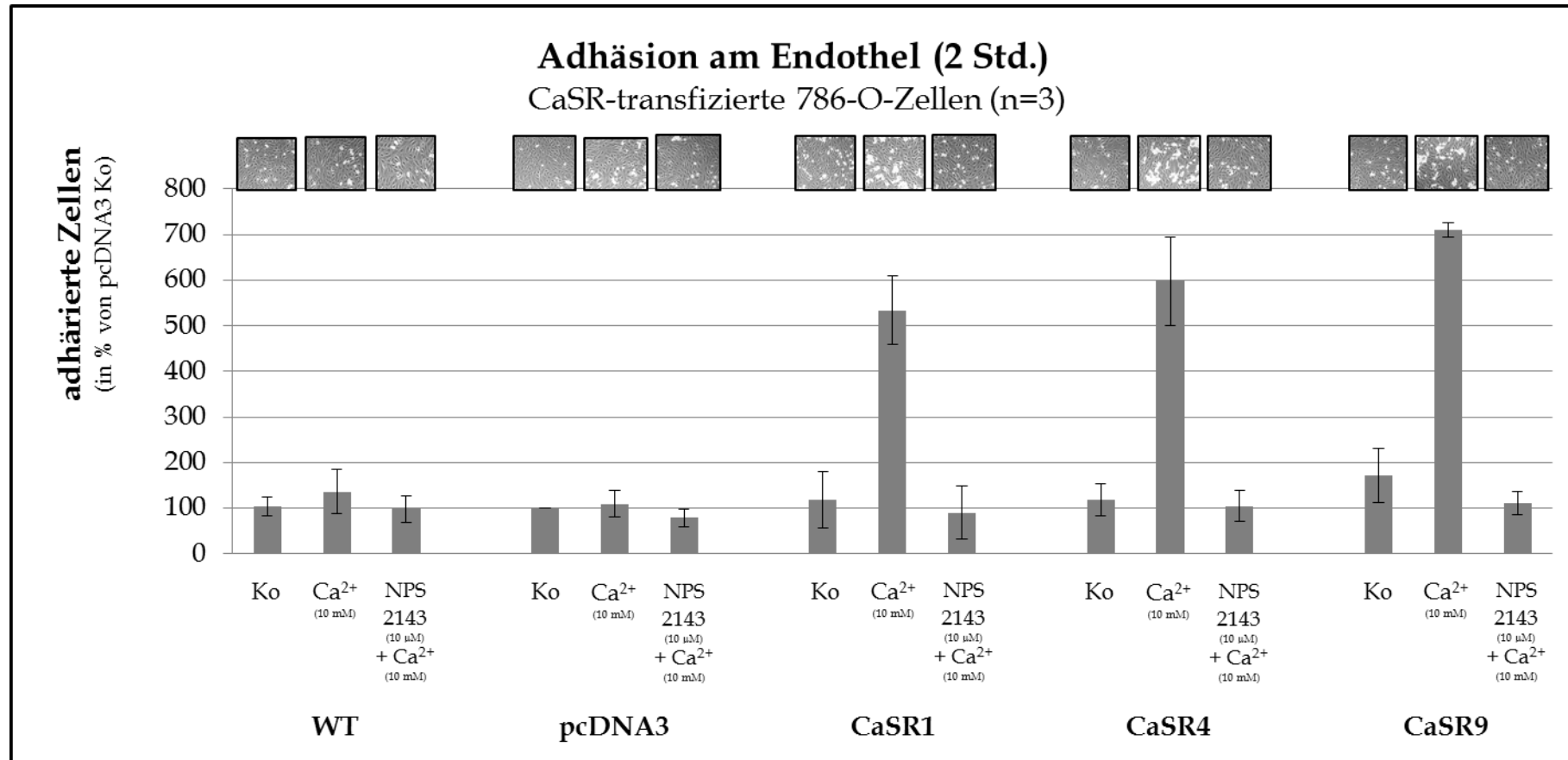


Abbildung 36: Adhäsion der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen an Endothel (HUVEC). Die Behandlungen mit Calcium bzw. NPS2143 + Calcium führten in den WT- bzw. Leervektor-transfizierten Zellen zu keiner stärkeren Adhäsion an HUVEC. Bei den CaSR-exprimierenden Klonen zeigte sich durch eine vorab durchgeführte Behandlung mit Calcium eine deutliche Steigerung der Adhäsion, die sich im Bereich zwischen 530 % (CaSR1) und 710 % (CaSR9) einpendelte. Durch die zusätzliche Behandlung mit NPS2143 konnte der Effekt aufgehoben werden, sodass die Adhäsion nahe dem Niveau der unbehandelten Kontrollzellen lag. Alle Werte wurden in Relation der unbehandelten und Leervektor-transfizierten Kontrolle (pcDNA3 = 100 %) gesetzt.

3.2.2.5 Calcium verstärkt die Proliferation von CaSR-transfizierten Zellen

Um die Auswirkungen auf die Proliferation der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen zu ermitteln, wurden die einzelnen Klone mit Calcium (10 mM - 30 Min.), NPS2143 (10 μ M - 1 Std.) oder mit einer Kombination aus NPS2143 (10 μ M - 1 Std.) und Calcium (10 mM - 30 Min.) behandelt. Hierbei zeigten die Leervektor-transfizierten Zellen keine Reaktion auf die Calcium-Behandlung, wohingegen eine Behandlung mit NPS2143 und auch die Kombinationsbehandlung zu einer deutlichen Reduktion der Proliferation führten (\sim -60 % im Vergleich zur Kontrolle). In allen drei CaSR-exprimierenden Klonen wurde nach Behandlung mit Calcium eine Steigerung der Proliferation gemessen, die im Bereich zwischen 50 % (CaSR9) und 62 % (CaSR4) lag. Nach Kombinationsbehandlung mit NPS2143 und Calcium zeigten die Zellen ein deutlich geringeres Proliferationsverhalten als die Calcium-behandelten Zellen. Hierbei lag das Proliferationspotential lediglich zwischen 57 % (CaSR9) und 82 % (CaSR1) im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Behandlung mit NPS2143 führte bei allen drei CaSR-exprimierenden Klonen zu einer noch stärkeren Abnahme der Proliferation, die nur noch 63 % (CaSR1) bis 50 % (CaSR9) des Kontrollniveaus erreichte (Abbildung 37). Alle Werte wurden in Relation zu den unbehandelten Leervektor-transfizierten Kontrollen gesetzt (pcDNA3 Ko = 100 %).

Neben den CaSR-transfizierten 786-O-Zellen wurden auch die CaSR-HEK-293-Zellen auf Unterschiede im Proliferationsverhalten nach Calcium, NPS2143 und Kombinationsbehandlung untersucht. Die Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min.) führte zu einer Steigerung der Proliferation um etwa 28 % in den Leervektor-transfizierten Zellen. In den beiden CaSR-exprimierenden Klonen wurde eine stärkere Proliferation gemessen, die im Bereich zwischen 38 % (CaSR1) und 42 % (CaSR4) lag. Die Kombinationsbehandlung NPS2143 und Calcium führte in den Leervektor-transfizierten Zellen zu einer deutlichen Reduktion der Proliferation um etwa 40 %. Die Auswirkungen der Kombinationsbehandlungen auf die Klone CaSR1 und CaSR4 führte zur Umkehr des Effekts der Calcium-Behandlung. Die Behandlung mit NPS2143 führte in den Kontrollzellen und dem Klon CaSR1 zu einer Proliferations-Reduktion um etwa 35 %. Klon CaSR4 wurde hingegen durch die Behandlung nicht beeinflusst (Abbildung 38). Alle Werte wurden in Relation zu den

unbehandelten, Leervektor-transfizierten Kontrollzellen gesetzt (pcDNA3 Ko = 100 %).

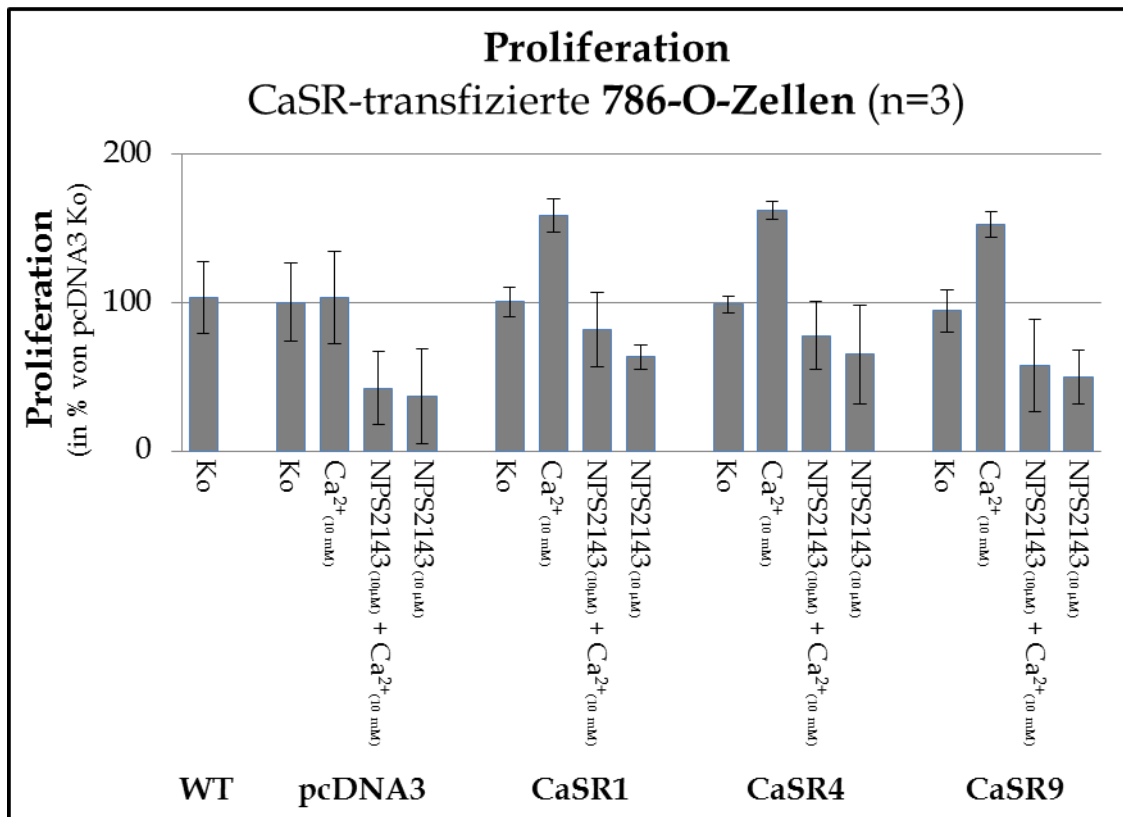


Abbildung 37: Proliferation der CaSR-transfizierten 786-O Zellen nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min.), NPS2143 (10 µM - 1 Std.) oder einer Kombination daraus. Die Kontrollzellen zeigten nach Behandlung mit NPS2143 bzw. der Kombinationsbehandlung eine deutliche Reduktion der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle. Eine 30 minütige Calcium-Behandlung führte in allen drei CaSR-exprimierenden Klonen zu einer Proliferationssteigerung um bis zu 60 %. Die Proliferationswerte nach NPS2143- bzw. Kombinationsbehandlung lagen z.T. deutlich unter dem Niveau der Kontrollzellen. Alle Werte wurden in Relation zu den Leervektor-transfizierten Kontrollen (pcDNA3 Ko = 100 %) gesetzt.

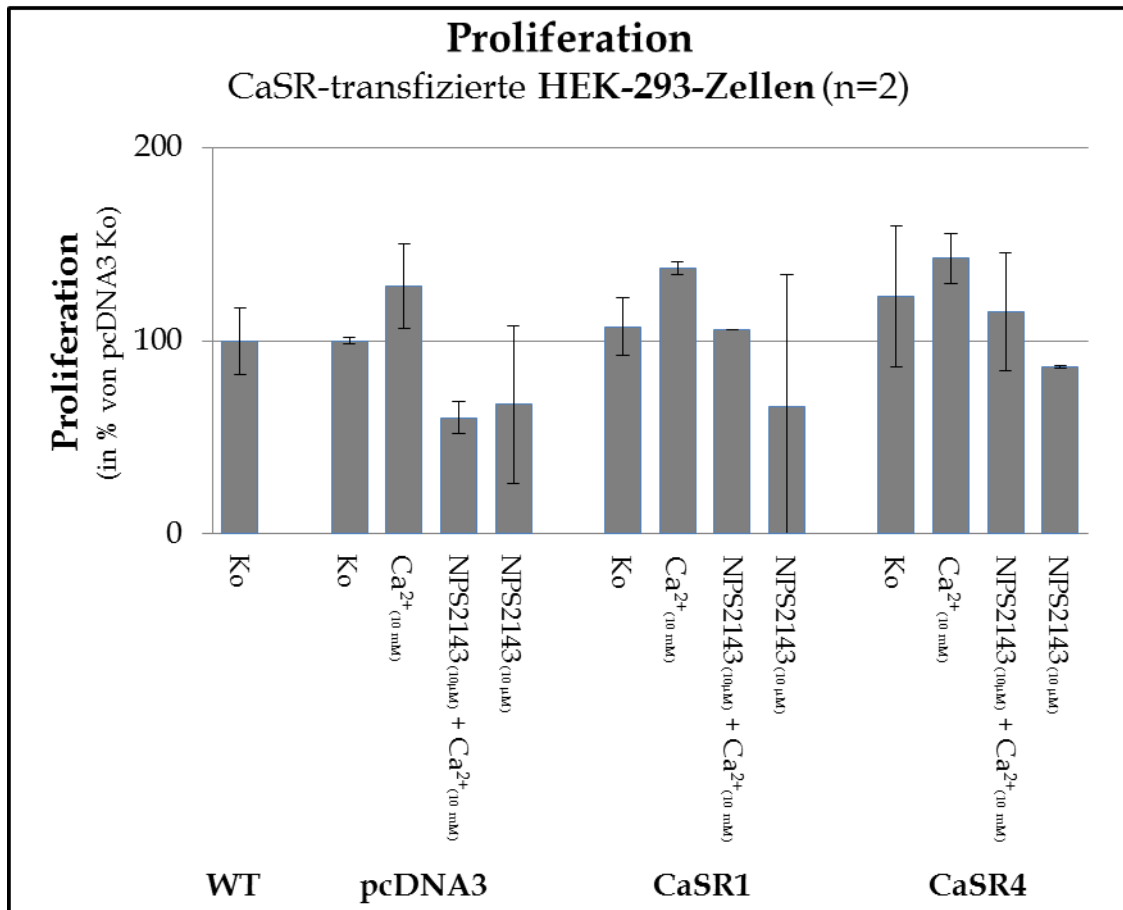


Abbildung 38: Proliferation der CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min.), NPS2143 (10 μM - 1 Std.) oder einer Kombination daraus. Die Kontrollzellen zeigen nach Behandlung mit NPS2143 bzw. der Kombinationsbehandlung eine deutliche Reduktion der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle. Die Behandlung mit Calcium führte in den Kontrollzellen zu einer leichten Steigerung der Proliferation um etwa 28 %. Die gleiche Behandlung steigerte die Proliferation der CaSR-exprimierenden Klone um bis zu 42 %. Die Kombinationsbehandlung führte in den Klonen CaSR1 und CaSR4 zu einer Umkehr des Calcium-bedingten Effekts. Die Behandlung mit NPS2143 zeigte lediglich in den Zellen des Klons CaSR1 einen Effekt, der zu einer Abnahme der Proliferation führte. Alle Werte wurden in Relation zu den Kontrollen (pcDNA3 Ko = 100 %) gesetzt.

3.2.3 Phospho Kinase-Array - Bestimmung relevanter Signalwege

Die Ergebnisse aus den funktionellen Assays zeigten, dass die CaSR-transfizierten Nierenzellen auf einen Calciumstimulus mit gesteigerter Adhäsion, Migration und Proliferation reagieren. Zur Analyse daran beteiligter, auf Proteinebene relevanter Signalwege wurde ein Phospho Kinase-Array durchgeführt, der es ermöglicht im Hochdurchsatzverfahren die Status von 46 verschiedenen intrazellulären Kinasen parallel zu untersuchen. Hierfür wurden, wie in Abschnitt 2.2.2.5 beschrieben, Proteine verschieden-behandelter CaSR-transfizierter 786-O-Zellen (exemplarisch Klon CaSR1) samt Kontrolle üN mit den im Kit beigelegten Membranen inkubiert.

Nach quantitativer Auswertung des Phospho Kinase-Arrays konnten in verschiedenen Signalwegen z.T. deutlich erhöhte Aktivitätssteigerungen festgestellt werden. Die Behandlung mit Calcium (5 mM) führte zu einer Aktivitätssteigerung der Kinase JNK (ca. 230 %), p38 α (~146 %) und AKT1/2/3 (~250 %). Durch zusätzliche Behandlung mit NPS2143 (10 μ M) konnte der Effekt für JNK aufgehoben werden. Trotz NPS2143-Behandlung kam es zu einer Erhöhung der Aktivität von AKT1/2/3. Durch die Behandlung der Zellen mit Cinacalcet (10 μ M) kam es zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung von JNK (>300 %) und p38 α (~204 %) (Abbildung 39 A). Durch die Behandlung der CaSR1-Zellen mit Calcium zeigte sich eine deutliche Steigerung in der Aktivität der Kinasen ERK1/2 (~175 %), CREB (150 %) und c-Jun (210 %), die durch die Behandlung mit NPS2143 wieder aufgehoben wurde. Durch eine Kombinationsbehandlung mit Cinacalcet (10 μ M) und Calcium (5 mM) zeigte sich eine gesteigerte Aktivität von CREB (~240 %) und c-Jun (~300 %), wohingegen die Aktivität von ERK1/2 nur leicht gesteigert wurde (Abbildung 39 B). Ausgehend von diesen Resultaten wurden gezielt Western Blot-Analysen durchgeführt, um die gefundenen Ergebnisse zu verifizieren.

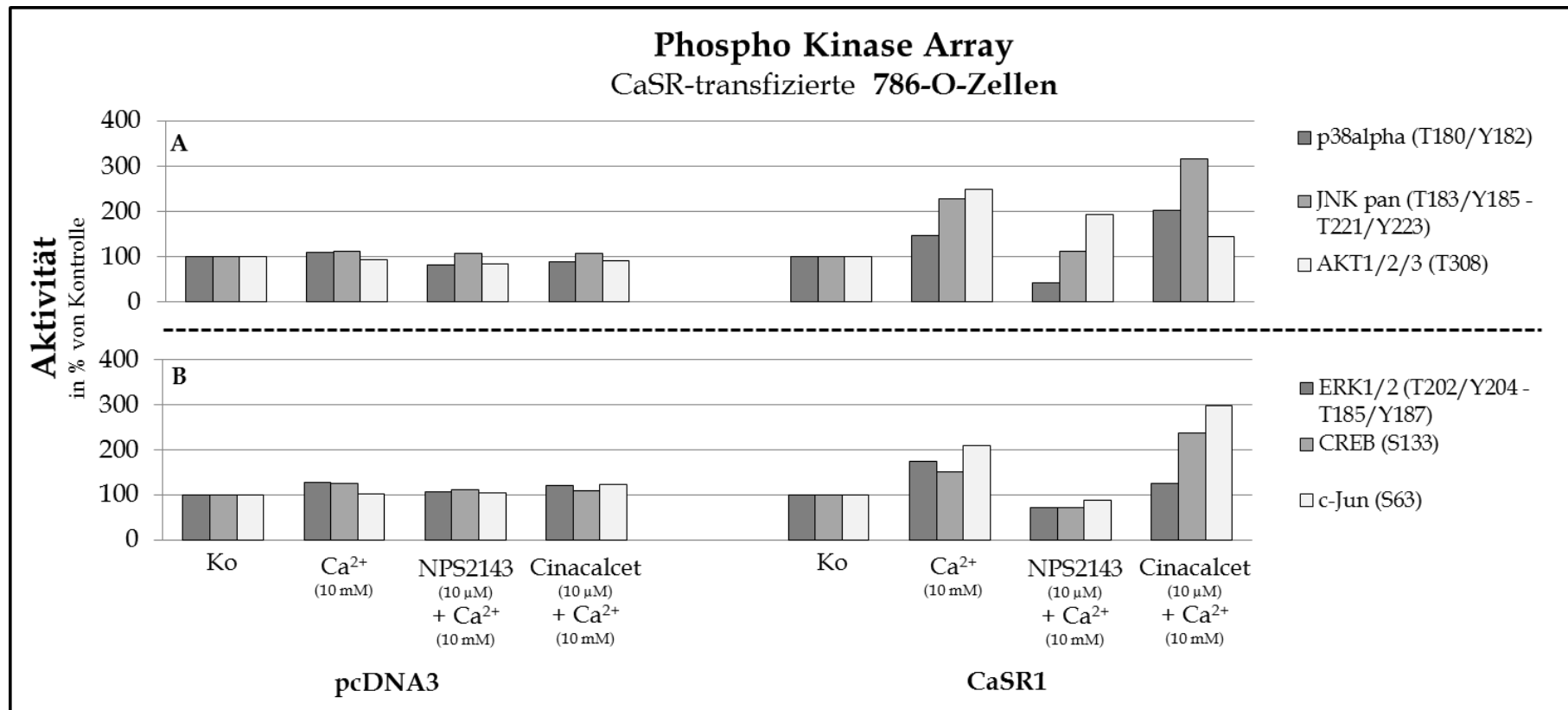


Abbildung 39: Phospho Kinase-Array des CaSR-transfizierten Klons CaSR1 sowie des Leervektor-transfizierten Klons als Kontrolle nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min.) oder Kombination aus Calcium + NPS2143 (10 μM - 1 Std.) bzw. Cinacalcet (10 μM - 1 Std.). A. Die Behandlung der Leervektor-transfizierten Zellen zeigte keinerlei Auswirkungen auf intrazelluläre Kinasen. Die Behandlung mit Calcium (10 mM) führte im CaSR-transfizierten Klon zu einer Aktivitätssteigerung der Kinase JNK (~230 %), AMPKα1 (~180 %) und AKT1/2/3 (~250 %). Durch zusätzliche Behandlung mit NPS2143 (10 μM) konnte der Effekt für JNK und AMPKα1 aufgehoben werden. Trotz NPS2143-Behandlung kam es bei dem Klon CaSR1 zu einer Erhöhung der Aktivität von AKT1/2/3. Durch die Behandlung der Zellen mit Cinacalcet (10 μM) kam es zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung von JNK (>300 %) und AMPKα1 (~250 %). **B.** Wie bereits in Abbildung 39A dargestellt, führte die Behandlung der Leervektor-transfizierten Zellen zu keiner relevanten Änderung im Aktivitätspotential der intrazellulären Kinasen. Die Behandlung mit Calcium zeigte in Klon CaSR1 eine deutliche Steigerung der Aktivität der Kinasen ERK1/2 (174 %), CREB (150 %) und c-Jun (210 %), die durch die Behandlung mit NPS2143 wieder aufgehoben wurde. Durch die Kombinationsbehandlung mit Cinacalcet und Calcium zeigte sich eine gesteigerte Aktivität von CREB (~240 %) und c-Jun (~300 %), wohingegen die Aktivität von ERK1/2 nahezu unverändert blieb. Die Auswertung der Ergebnisse wurde in Relation der jeweiligen Kontrolle (Zellen ohne Behandlung) gesetzt.

3.2.4 Relevante Signalmediatoren der Migration, Adhäsion und Proliferation

Die Ergebnisse des Phospho Kinase-Array deuteten darauf hin, dass einige Signalwege an den in Adhäsions-, Migrations- und Proliferationsversuchen gemessenen Ergebnissen nach Calcium-Stimulation beteiligt waren. Die Bedeutung dieser und weiterer Signalwege, die sich bereits in anderen Arbeiten als prometastasierend herausgestellt haben, galt es in Western Blot-Analysen nachzuweisen bzw. zu verifizieren. Hierfür wurden, wie bereits in Abschnitt 2.2.2.6 beschrieben, Zellen auf Zellkulturschalen ausplattiert, mit Calcium (10 mM - 30 Min.), NPS2143 (10 µM - 1 Std.), Cinacalcet (10 µM - 1 Std.) oder Kombinationen daraus behandelt, die Proteine extrahiert und Western Blots durchgeführt, um die Banden quantitativ auszuwerten. Da es in den meisten Fällen nicht möglich war die Proteinbanden mit Hilfe der dazugehörigen beta-Aktin-Messwerte zu normalisieren, wurden Coomassie-Färbungen der Membranen angefertigt. Die daraus resultierenden Ergebnisse wurden in Relation zu den unbehandelten, Leervektor-transfizierten Kontrollen gesetzt. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Klone gezeigt, die die größten Unterschiede in ihrem Proteinmuster nach Behandlung zeigten.

3.2.4.1 Proteinmenge von Gesamt ERK und phospho ERK ((T202/Y204)/(T185/Y187)) der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen

In den Leervektor-transfizierten Zellen der Linie 786-O wurde die gesamte Proteinmenge von ERK bei jedweder Behandlung lediglich leicht reduziert. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch für den CaSR-exprimierenden Klon CaSR1 erzielt. Hierbei lag die Proteinmenge immer 15 % - 35 % unter dem Niveau der unbehandelten Leervektor-Kontrollen. Eine Steigerung der Proteinmenge um 40 % wurde hingegen bei den WT-Zellen gemessen (Abbildung 40 A). Bei der Bestimmung von aktiviertem ERK wurde in den Leervektor-transfizierten Zellen bei jeder Behandlung eine leichte Reduktion der Proteinmenge gemessen. Im Gegensatz dazu zeigten die unbehandelten Zellen des Klons CaSR1 eine Steigerung der Menge um etwa 70 % im Vergleich zur Kontrolle. Noch deutlicher fielen die Messwerte nach Calcium-

Behandlung aus. Hierbei konnte eine Steigerung der Proteinmenge von 170 % im Vergleich zu den Kontrollzellen gemessen werden. Durch die zusätzliche Verwendung von NPS2143 konnte dieser Effekt wieder aufgehoben werden. Die Behandlung mit NPS2143 zeigte keine Wirkung. Durch die Kombinationsbehandlung mit Cinacalcet und Calcium konnte die Proteinmenge aktivierter ERK-Moleküle wiederum deutlich gesteigert werden, lag aber mit knapp 250 % unter dem Niveau der Calcium-Behandlung (Abbildung 40 B). Alle Werte wurden in Relation zu den Kontrollzellen dargestellt (pcDNA3 Ko = 100 %).

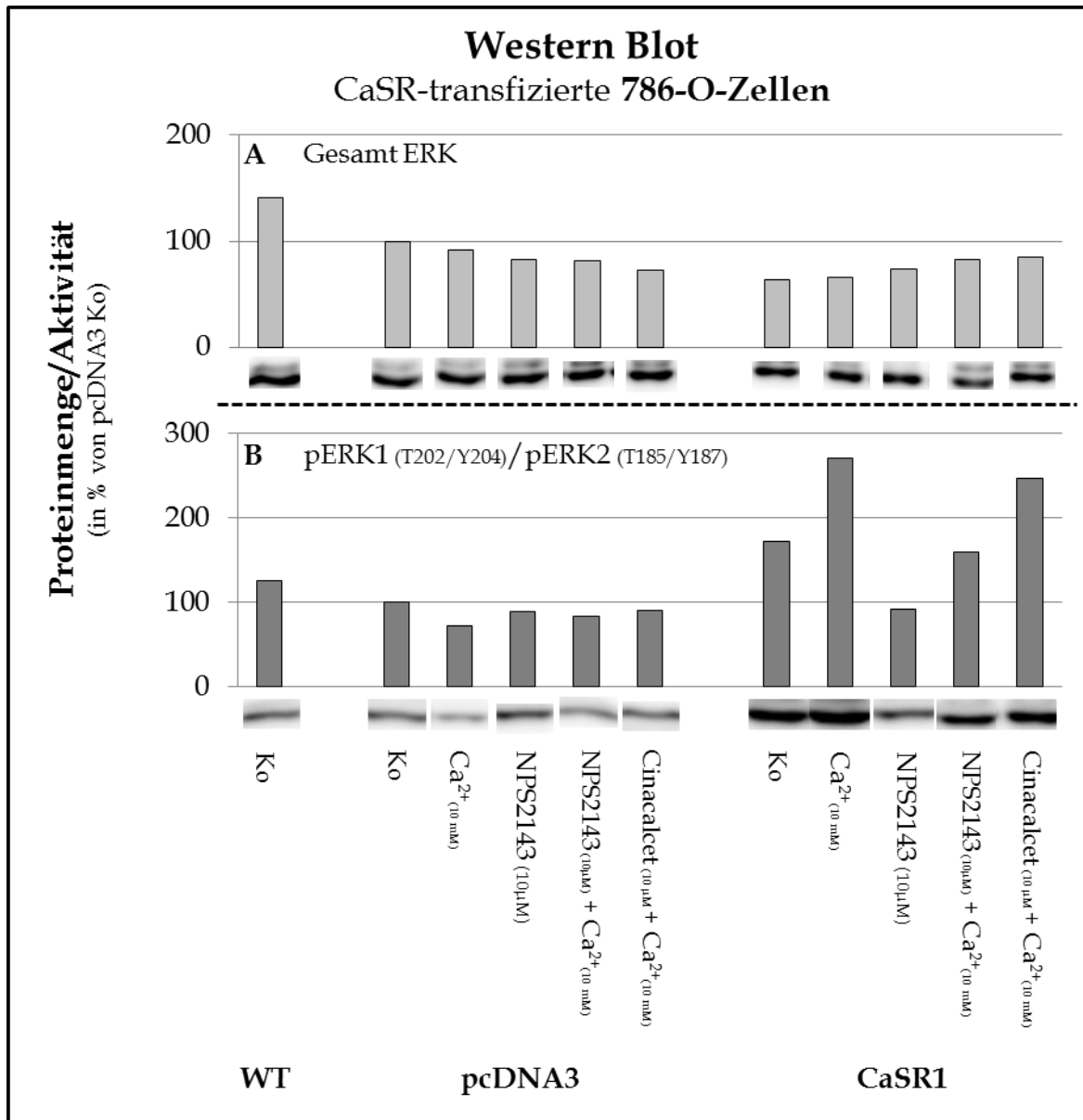


Abbildung 40: Western Blot ERK1/2/phospho ERK1/2 der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min.), NPS2143 (10 μM - 1 Std.) oder Cinacalcet (10 μM - 1 Std.) bzw. Kombinationen daraus. **A.** In der Messung der gesamten Proteinmenge für ERK1/2 führte jedwede Behandlung der Kontrollzellen zu einer leichten Reduktion im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Die Proteinmengen der behandelten und unbehandelten Klone 786-O CaSR1 wiesen ausnahmslos deutlich geringere Mengen als die Kontrollzellen auf. Lediglich bei den WT-Zellen der Linie 786-O lag die Proteinmenge 40 % höher als die Leervektor-transfizierte Kontrolle. **B.** In den Leervektor-transfizierten Zellen wurde nach jeglicher Behandlung eine leichte Reduktion der Aktivität von ERK1/2 festgestellt. Bereits in den unbehandelten Zellen des Klons CaSR1 konnte eine um ~70 % gesteigerte ERK-Aktivität festgestellt werden, als in den unbehandelten Kontrollzellen. Noch deutlicher war die Aktivitätssteigerung der Calcium-behandelten CaSR1 Klone, die bei 170 % lag. Durch die Kombinationsbehandlung aus NPS2143 und Calcium konnte der Effekt der gesteigerten Aktivität aufgehoben werden. Die Behandlung mit NPS2143 alleine zeigte keine Auswirkung auf die Aktivität der Kinasen. Die Kombinationsbehandlung aus Cinacalcet und Calcium führte ebenfalls zu einer starken Erhöhung der ERK-Aktivität, die aber unter dem Niveau der Calcium-behandelten Klone lag. Alle Werte wurden in Relation zur Kontrolle (pcDNA3 Ko = 100 %) dargestellt.

3.2.4.2 Proteinmenge von Gesamt ERK und phospho ERK

((T202/Y204)/(T185/Y187)) der CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen

In der Bestimmung der Proteinmenge von Gesamt-ERK zeigte sich in den Leervektor-transfizierten HEK-293-Zellen lediglich bei Kombinationsbehandlung mit NPS2143 und Calcium eine Reduktion um etwa 60 % im Vergleich zu den Kontrollzellen. Alle übrigen Werte blieben trotz verschiedener Behandlungen stabil. Bei den Zellen des Klons CaSR1 hatte keine Behandlung deutliche Auswirkungen auf die Proteinmenge von ERK1/2 (Abbildung 41 A). Der Unterschied bei der Proteinmenge aktivierter ERK-Moleküle manifestierte sich nach Calcium-Behandlung sehr deutlich: Die Leervektor-transfizierten Zellen zeigten nach Behandlung mit Calcium, NPS2143, Cinacalcet oder einer Kombination daraus ein ähnlich starkes Niveau wie das unbehandelte Pendant. Bei der Messung der unbehandelten CaSR-exprimierenden Zellen des Klons CaSR1 zeigte sich jedoch ein deutlicher Mengenzuwachs an aktivierten ERK1/2-Molekülen um ca. 400 % im Vergleich zur Kontrolle. Durch eine Behandlung mit Calcium konnte die Menge sogar auf das 29-fache gesteigert werden. Durch die zusätzliche Behandlung mit NPS2143 wurde der Effekt wieder aufgehoben. Die Behandlung mit NPS2143 allein zeigte keine Auswirkung auf die Proteinmenge von aktiviertem ERK. Die Kombinationsbehandlung aus Cinacalcet und Calcium führte wieder zu einer starken Steigerung, die mit einer ca. 25-fachen Erhöhung jedoch noch deutlich unter dem Niveau der Calcium-Behandlung lag (Abbildung 41 B). Alle Werte wurden in Relation zur Kontrolle (pcDNA3 Ko = 100 %) gesetzt.

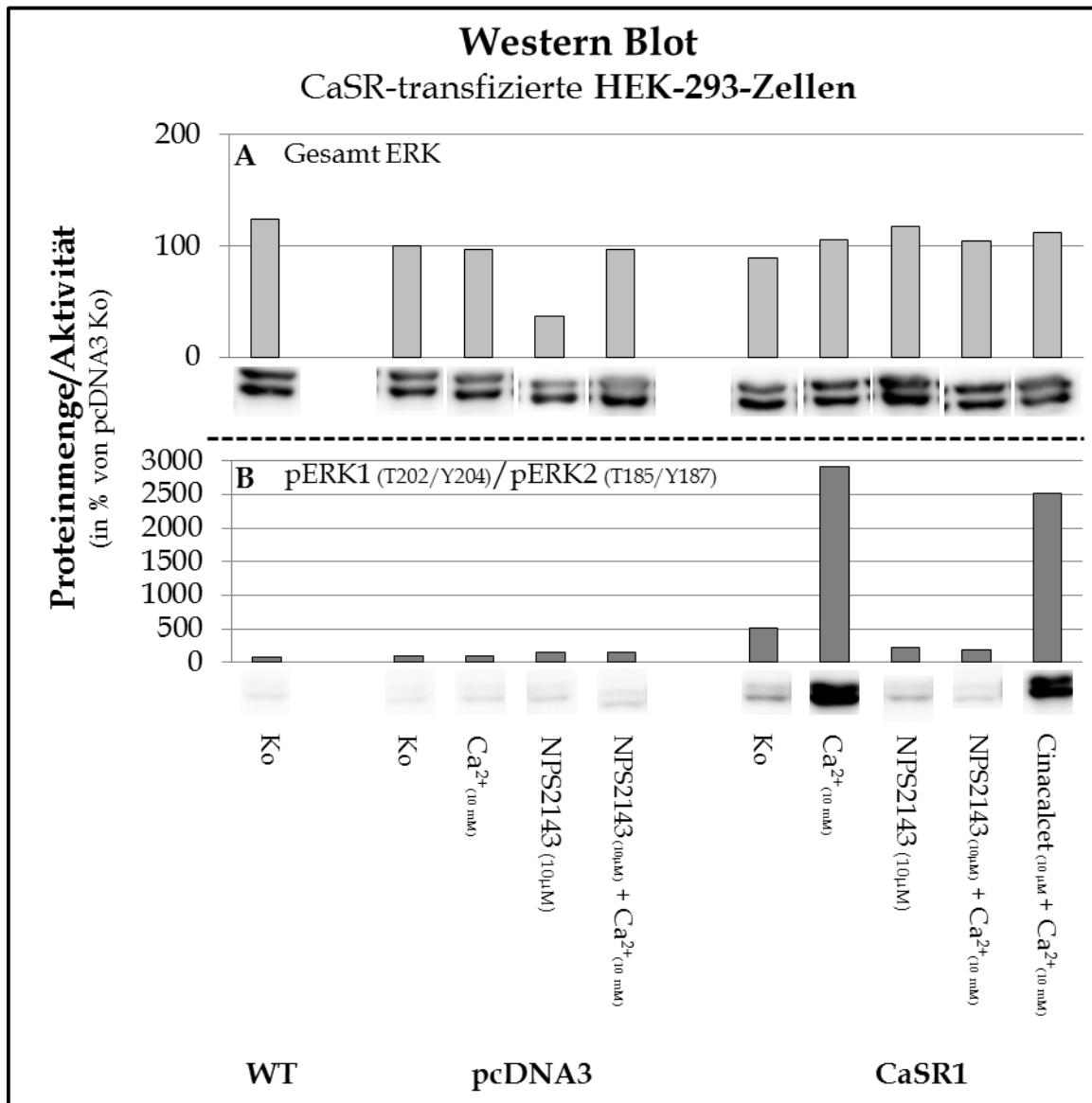


Abbildung 41: Western Blot ERK1/2/phospho ERK1/2 der CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min.), NPS2143 (10 μM - 1 Std.) oder Cinacalcet (10 μM - 1 Std.) bzw. Kombinationen daraus. **A.** In der Messung der gesamten Proteinmenge von ERK1/2 zeigten sich abgesehen von der Kombinationsbehandlung aus NPS2143 und Calcium bei den Leervektor-transfizierten Kontrollzellen (~60 %), keine deutlichen Unterschiede zu den Kontrollen. **B.** In den Aktivitätsanalysen der Kinasen ERK1/2 zeigte sich bereits in den unbehandelten Zellen des Klons CaSR1 eine starke Aktivitätszunahme um bis zu 400 %. Durch die Behandlung mit Calcium wurde eine Aktivitätszunahme um das 29-fache im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Dieser Effekt konnte durch die zusätzliche Behandlung mit NPS2143 umgekehrt werden. Die Behandlung mit NPS2143 alleine hatte keinen Einfluss auf die Aktivität von ERK. Eine Kombination aus Cinacalcet und Calcium führte wiederum zu einer starken Aktivität von ERK, die aber deutlich unter dem Niveau der Calcium-Behandlung lag. Alle Werte wurden in Relation zur Kontrolle (pcDNA3 Ko = 100 %) dargestellt.

3.2.4.3 Proteinmenge von Gesamt AKT und phospho AKT(S473) der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen

Bei der Bestimmung der Proteinmenge von Gesamt AKT, Kinase eines für die Tumorgenese wichtigen Signalwegs, konnten in den Leervektor-transfizierten Zellen trotz Behandlung keine deutlichen Aktivitätsunterschiede im Vergleich zu den unbehandelten Leervektor-transfizierten Kontrollen festgestellt werden. Die Aktivität der WT-Zellen lag leicht unter dem Kontrollniveau. Die Zellen des Klons CaSR1 zeigten lediglich bei Behandlung mit der Kombination aus NPS2143 + Calcium bzw. Cinacalcet + Calcium leichte Reduktionen in der Aktivität von AKT die im Bereich von 24 % bzw. 35 % lagen (Abbildung 42 A). AKT war in den Leervektor-transfizierten Zellen leicht erhöht phosphoryliert. Die Erhöhungen lagen im Bereich von ~35 % für NPS 2143 und Calcium bzw. 45 % für Cinacalcet + Calcium. Bei den unbehandelten WT-Zellen wurde ein Anstieg der AKT-Aktivität um etwa 60 % gemessen. Die unbehandelten Zellen des Klons CaSR1 zeigten eine leichte Aktivitätssteigerung um 26 %. Nach Behandlung mit Calcium wurde ein Aktivitätszuwachs um 100 % im Vergleich zu den Kontrollen gemessen. Durch die zusätzliche Behandlung mit NPS2143 wurde der Effekt aufgehoben. NPS2143-behandelte Zellen zeigten keinen Aktivitätsunterschied im Vergleich zu den Kontrollen. Durch die Kombinationsbehandlung mit Cinacalcet und Calcium wurde erneut ein Niveau leicht unter dem der Calcium-Behandlung erreicht (Abbildung 42 B). Alle gemessenen Werte wurden in Relation zu den Kontrollzellen (pcDNA3 Ko = 100 %) gesetzt. Die Messungen der Proteinmenge von Gesamt und aktiviertem AKT bei den CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen wurden durchgeführt, zeigten aber in Bezug auf Unterschiede zu den Kontrollzellen keine nennenswerten Änderungen (ohne Abbildung).

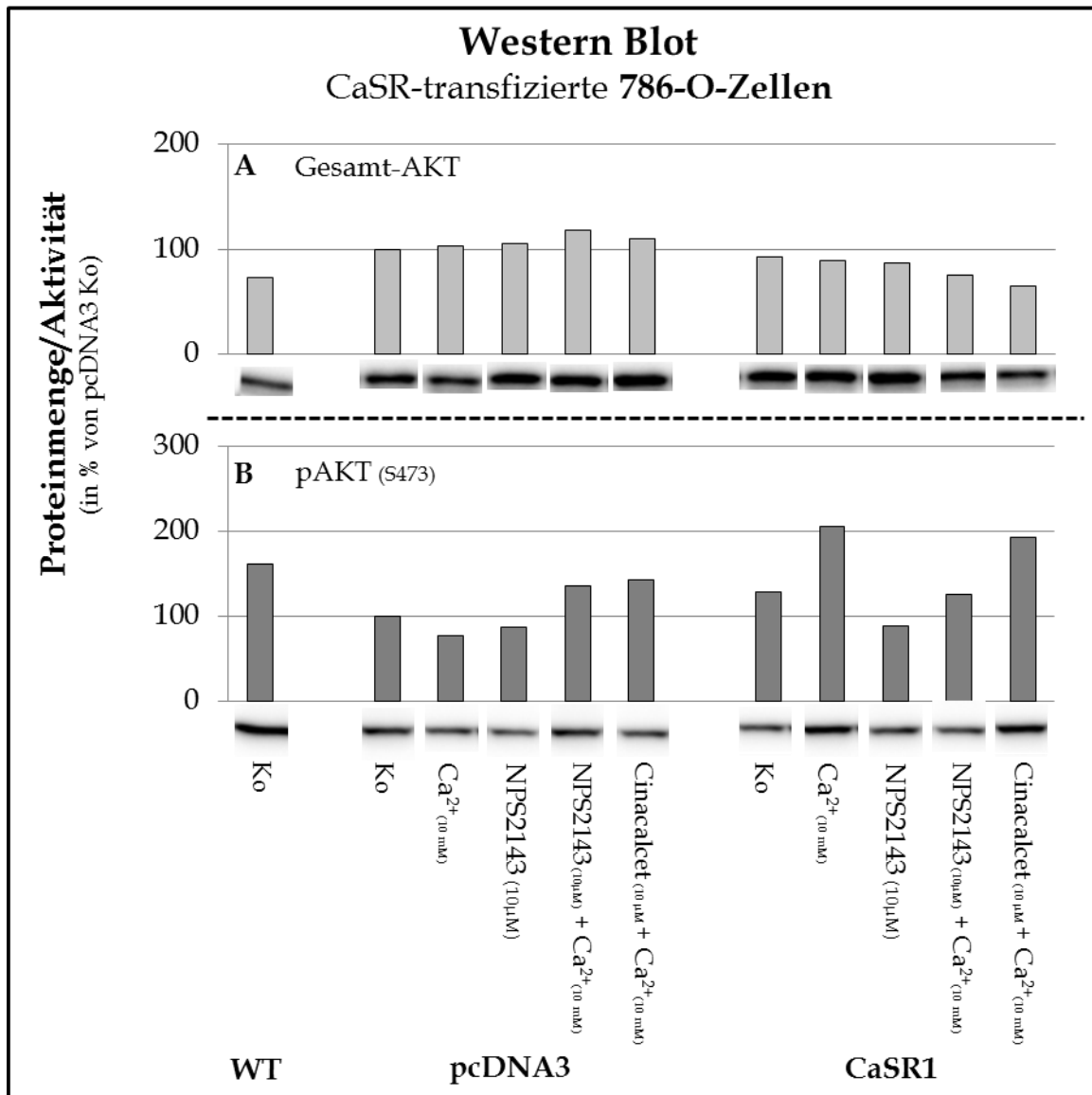


Abbildung 42: Western Blot von Gesamt AKT/phospho AKT der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min.), NPS2143 (10 μM - 1 Std.) oder Cinacalcet (10 μM - 1 Std.) bzw. Kombinationen daraus. A. Die Messung der Proteinmenge von Gesamt AKT zeigte in den Leervektor-transfizierten Zellen trotz Behandlung keinen großen Unterschied zu den unbehandelten Kontrollzellen. Die Zellen des Klons CaSR1 zeigten nach Behandlung mit NPS2143 + Calcium und Cinacalcet + Calcium keinen Unterschied zur AKT-Proteinmenge im Vergleich zu den Kontrollen. **B.** Die Messung der Aktivität von AKT zeigte in den Leervektor-transfizierten Zellen nach Behandlung mit Calcium oder NPS2143 alleine keinen großen Unterschied zur Kontrolle. Beide Kombinationsbehandlungen führten hingegen zu leichten Aktivitätssteigerungen von AKT. In den unbehandelten Zellen des Klons CaSR1 manifestierte sich ein leichter Anstieg der AKT-Aktivität. Die Behandlung der Zellen führte zu einem deutlichen Anstieg der Aktivität um ca. 100 %. Durch die zusätzliche Behandlung mit NPS2143 verschwand der Effekt. Die Behandlung mit NPS2143 hatte keine Auswirkung auf die Aktivität. Die Verwendung von Cinacalcet und Calcium führte zu einem starken Anstieg der AKT-Aktivität, die aber noch unter dem Niveau der Calcium-Behandlung lag. Die WT-Zellen hingegen zeigten eine insgesamt stärkere AKT-Aktivität als die unbehandelten, Leervektor-transfizierten Kontrollen. Alle Werte wurden in Relation zu den unbehandelten Kontrollen (pcDNA3 Ko = 100 %) gesetzt.

3.2.4.4 Proteinmenge von phospho SAP/JNK (T183/Y189) und phospho P90RSK (S380) der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen

Bei der Messung der Aktivität von SAP/JNK in den 786-O Zellen wurde deutlich, dass die Werte der WT-Zellen doppelt so hoch waren, wie die der unbehandelten Leervektor-transfizierten Kontrollen. In Leervektor-transfizierten Kontrollen führten lediglich die Behandlungen mit den Kombinationen aus NPS2143 + Calcium bzw. Cinacalcet + Calcium zu einer leichten Aktivitätssteigerung. Bereits ohne Behandlung zeigten die Zellen des CaSR-exprimierenden Klons CaSR1 mit einem Zuwachs von 178 % eine deutliche Steigerung der Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen. Durch den Einsatz von Calcium konnte eine Aktivitätssteigerung um 463 % gemessen werden. Durch die zusätzliche Behandlung mit NPS2143 wurde der Effekt wiederum aufgehoben. Die Behandlung mit NPS2143 alleine zeigte keine Auswirkungen auf die Aktivität von SAP/JNK. Durch die Kombinationsbehandlung mit Cinacalcet und Calcium wurde die Aktivität im CaSR1 Klon wieder gesteigert, erreichte aber mit einem Zuwachs von 438 % nicht ganz das Niveau der Calcium-Behandlung (Abbildung 43 A). Die Messung der Aktivität von P90RSK zeigte, dass in den unbehandelten WT-Zellen weniger Aktivität (-40 %) als in den unbehandelten Leervektor-transfizierten Kontrollen vorliegt. Lediglich die Behandlung mit Calcium bzw. Cinacalcet + Calcium führte in den Leervektor-transfizierten Zellen zu einer Reduktion der Aktivität von P90RSK um etwa die Hälfte bzw. 34 %. Das Aktivitätsniveau des unbehandelten CaSR1-Klons war im Vergleich zu den Kontrollen mit 21 % nur leicht erhöht. Durch die Behandlung mit Calcium konnte eine deutliche Steigerung der Aktivität um etwa 120 % festgestellt werden. Auch hier wurde durch den Einsatz von NPS2143 der Effekt wieder auf das Niveau der unbehandelten Zellen des Klons CaSR1 gesenkt. Die Behandlung mit NPS2143 führte zu einer Halbierung des Aktivitätsniveaus. Durch die Kombination aus Cinacalcet und Calcium wurde eine Aktivitätssteigerung von 133 % gemessen (Abbildung 43 B). Alle gemessenen Werte wurde in Relation zu den Kontrollzellen (pcDNA3 Ko = 100 %) gesetzt.

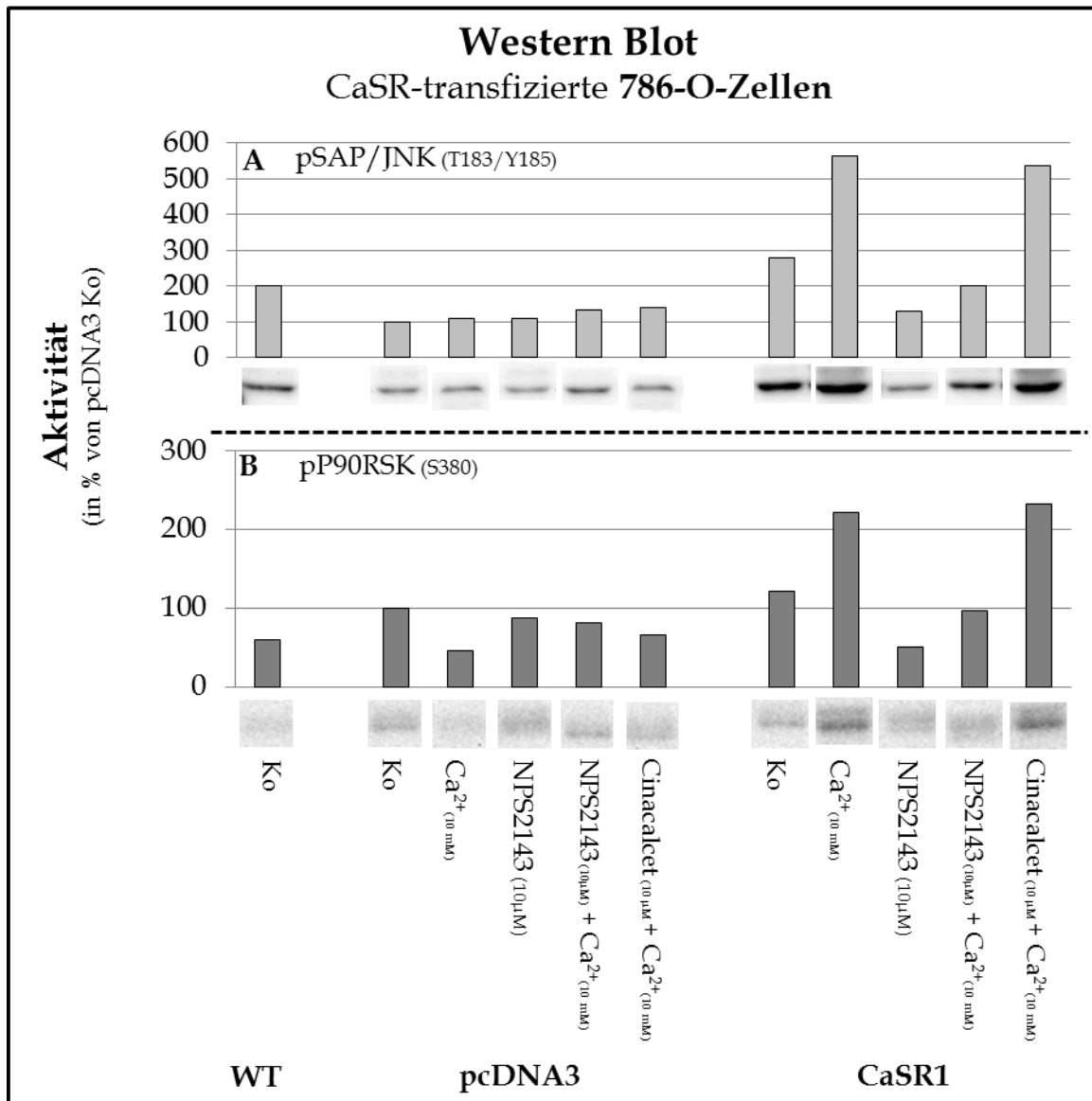


Abbildung 43: Western Blot von phospho SAP/JNK und phospho P90RSK der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min.), NPS2143 (10 μM - 1 Std.) oder Cinacalcet (10 μM - 1 Std.) bzw. Kombinationen daraus. **A.** Die Messung des Aktivitäts-Status von SAP/JNK der Leervektor-transfizierten Zellen nach genannten Behandlungen zeigte keinen großen Unterschied zu den unbehandelten Kontrollen. Die Aktivität von SAP/JNK in den unbehandelten WT-Zellen war doppelt so stark, wie in den Leervektor-transfizierten Kontrollen. Die Zellen des Klons CaSR1 zeigten bereits ohne Behandlung eine Steigerung der SAP/JNK-Aktivität von über 270 %. Durch die Behandlung mit Calcium wurde die Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen mehr als verfünffacht. Die zusätzliche Behandlung mit NPS2143 führte zu einer Aufhebung des Effekts. NPS2143 alleine hatte keine Auswirkung auf das Aktivitätslevel. Die Kombinationsbehandlung aus Cinacalcet und Calcium führte zu einem starken Zuwachs der Aktivität, jedoch blieb der Wert unter dem Niveau der Calcium-Behandlung. **B.** Im Vergleich zu den unbehandelten Leervektor-transfizierten Kontrollen zeigten die Behandlung mit Calcium alleine bzw. die Kombination aus Cinacalcet und Calcium einen Rückgang der Aktivität von P90RSK um ca. 50 % bzw. 34 %. Die unbehandelten Zellen des Klons CaSR1 zeigten ein ähnliches Aktivitätsniveau wie die Leervektor-Kontrollen. Durch die Behandlung mit Calcium kam es zu einem starken Aktivitätsanstieg um etwa 120 %. Durch die zusätzliche Behandlung mit NPS2143 wurde der Effekt wieder umgekehrt. NPS2143 alleine führte zu einer Reduktion in der Aktivität von P90RSK um 50 %. Die Kombinationsbehandlung aus Cinacalcet und Calcium führte wieder zu einem starken Anstieg der Aktivität, der mit 233 % im Vergleich zu den Kontrollen, leicht höher lag als das Niveau des Calcium-behandelten CaSR1-Klons. Alle Werte wurden in Relation zur Kontrolle (pcDNA3 Ko = 100 %) dargestellt.

3.2.4.5 Proteinmenge von phospho SAP/JNK (T183/Y189) der CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen

Die Aktivitätszustände der Kinase SAP/JNK wurde ebenfalls für die CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen samt Kontrollen bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass die SAP/JNK-Aktivität der WT-Zellen dem doppelten der Leervektor-transfizierten Kontrollzellen entsprach. Die Behandlung mit Calcium oder der Kombination aus Cinacalcet und Calcium führte zu keiner Auswirkung in der Aktivität. Die Kombinationsbehandlung zeigte trotz mehrfacher Durchführung des Experiments einen Nullwert. Schon bei den unbehandelten, CaSR-transfizierten Zellen des Klons CaSR1 konnte eine um das doppelte gesteigerte Aktivität von SAP/JNK festgestellt werden. Die Behandlung mit Calcium führte zu einem Wert von fast 800 % im Vergleich zu den Kontrollzellen. Wiederum konnte dieser Effekt durch die weitere Behandlung mit NPS2143 aufgehoben werden und der Aktivitätswert pendelte sich auf dem Niveau des unbehandelten Klons ein. Die Kombinationsbehandlung aus Cinacalcet und Calcium führte erneut zu einem starken Anstieg der Aktivität von SAP/JNK, erreichte aber nicht das Niveau der Calcium-Behandlung (Abbildung 44). Alle Werte wurden in Relation zu den Kontrollzellen (pcDNA3 Ko = 100 %) gesetzt. Phospho P90RSK konnte weder in den WT- noch in den transfizierten HEK-293-Zellen nachgewiesen werden.

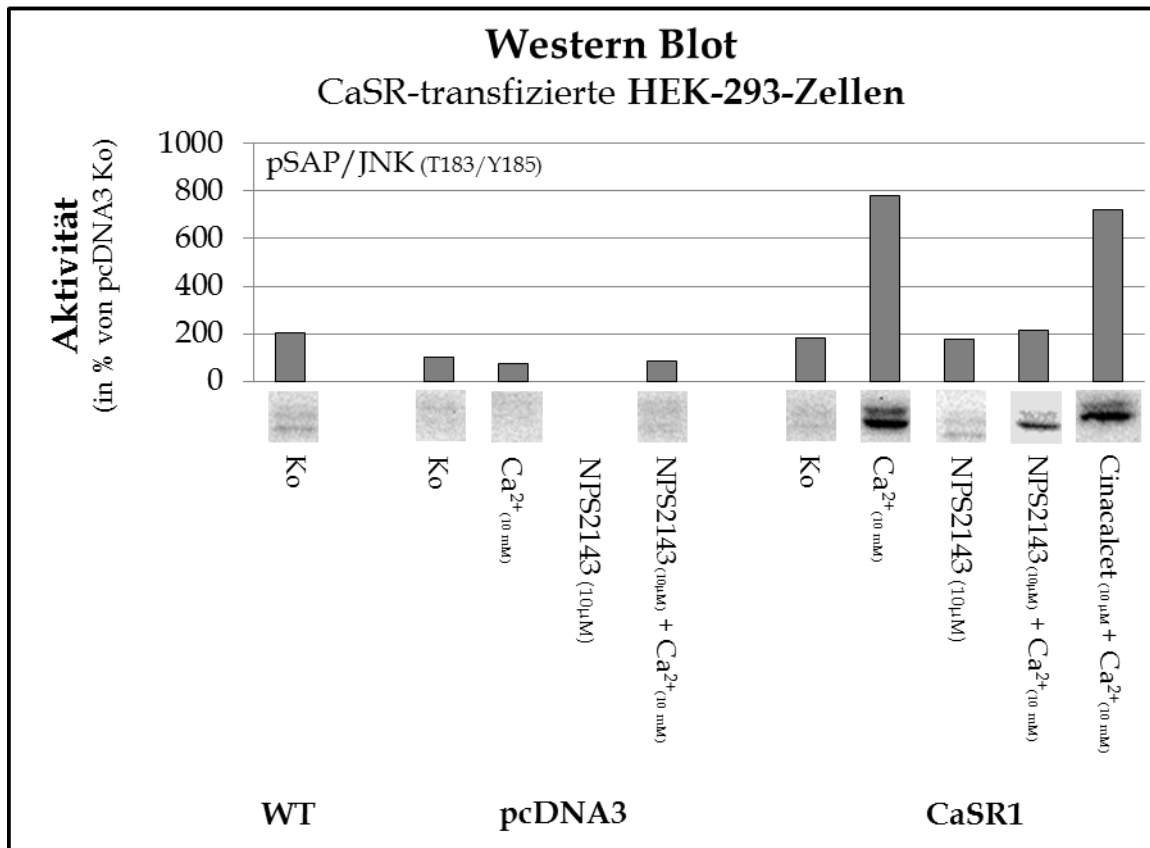


Abbildung 44: Western Blot von phospho SAP/JNK der CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min.), NPS2143 (10 μM - 1 Std.) oder Cinacalcet (10 μM - 1 Std.) bzw. Kombinationen daraus. Die unbehandelten WT-Zellen zeigten ein höheres Aktivitätsniveau als die Leervektor-transfizierten Kontrollzellen. Die Behandlungen der Leervektor-transfizierten Zellen zeigten abgesehen von der Kombinationsbehandlung NPS2143 + Calcium, bei dem keine Proteinbande detektiert werden konnte, keine Auswirkung auf den Aktivitätszustand von SAP/JNK. Bereits ohne Behandlung zeigten die Zellen des CaSR-exprimierenden Klons CaSR1 eine fast doppelt so hohe Aktivität als die Kontrollzellen. Durch die Behandlung mit Calcium kam es zu einer Steigerung der Aktivität auf knapp 800 %. Durch den weiteren Einsatz von NPS2143 wurde der Effekt aufgehoben. NPS2143 alleine hatte keinen Einfluss auf die Aktivität von SAP/JNK. Die Kombination aus Cinacalcet + Calcium führte wiederum zu einem deutlichen Zuwachs der Aktivität auf 750 % im Vergleich zu den Kontrollen. Alle Werte wurden in Relation zur Kontrolle (pcDNA3 Ko = 100 %) dargestellt.

3.2.4.6 Proteinmenge von phospho Paxillin (Y418) und phospho SHC (Y239/240) der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen

Nach der Behandlung mit Calcium oder NPS2143 kam es in den Leervektor-transfizierten 786-O-Zellen zu einer leichten Reduktion der Aktivität des Bindeproteins Paxillin um je etwa 30 %. Ein deutlicher Aktivitätsrückgang wurde hingegen bei den CaSR-exprimierenden Zellen des Klons CaSR9 nach Behandlung mit NPS2143 festgestellt. Dieser betrug etwa 61 % ausgehend vom Niveau der Kontrollzellen. Eine Behandlung mit Cinacalcet und Calcium führte hingegen zu einer Aktivitätssteigerung um 33 %. Calcium alleine oder aber die Kombination NPS2143 + Calcium

zeigten keine großen Auswirkungen auf den Aktivitätsstatus von Paxillin (Abbildung 45 A). Die unbehandelten WT-Zellen wiesen eine geringere SHC-Aktivität auf als die Leervektor-transfizierten Zellen. In den Leervektor-transfizierten Zellen führte eine Behandlung mit NPS2143 zu einer Aktivitätsreduktion um 40 % im Vergleich zu den Kontrollzellen. In den CaSR-exprimierenden Zellen des Klons CaSR9 führte eine Calcium-Behandlung zu einer Steigerung der Aktivität um 74 %. Die Kombination aus dem CaSR-Aktivator (Cinacalcet) und Calcium steigerte die SHC-Aktivität sogar um 96 %. Dieser Effekt konnte durch die Kombinationsbehandlung aus NPS2143 und Calcium wieder umgekehrt werden. NPS2143 allein hatte nur geringe Auswirkungen auf die Aktivität (Abbildung 45 B). Alle Werte wurden in Relation zu den unbehandelten Leervektor-Kontrollen (pcDNA3 Ko = 100 %) gesetzt.

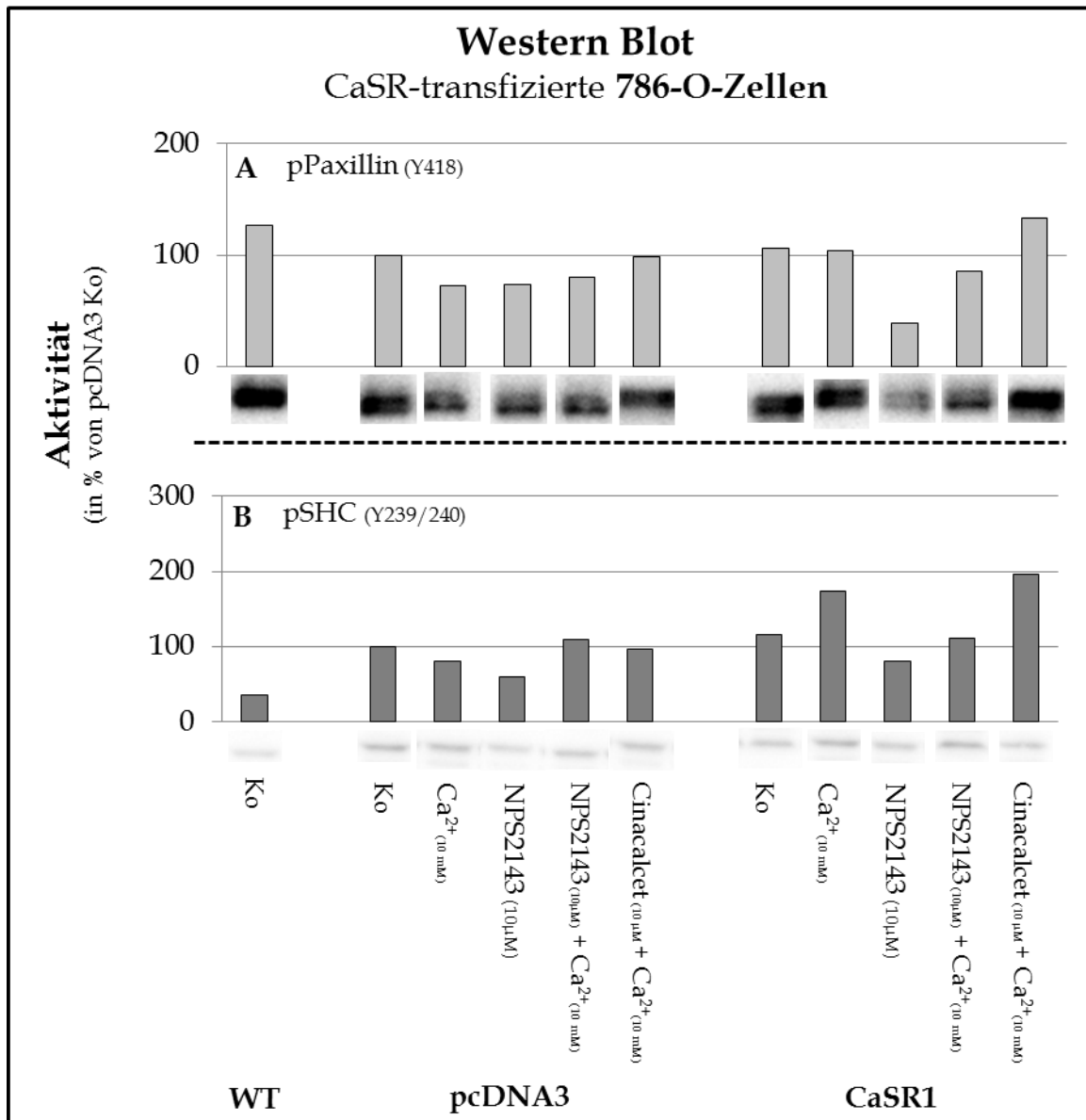


Abbildung 45: Western Blot von phospho Paxillin und phospho SHC der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min.), NPS2143 (10 µM - 1 Std.) oder Cinacalcet (10 µM - 1 Std.) bzw. Kombinationen daraus. **A.** Nach Behandlung mit Calcium oder NPS2143 zeigten die Leervektor-transfizierten Zellen eine leichte Reduktion der Aktivität von Paxillin um etwa je 30 %. Bei den CaSR-exprimierenden Zellen des Klons CaSR1 führte die Behandlung mit NPS2143 zu einem deutlichen Aktivitätsrückgang von Paxillin um etwa 60 %. Auf die Kombinationsbehandlung aus Cinacalcet und Calcium reagierten die Zellen mit einer Aktivitätssteigerung um 33 %. Calcium alleine bzw. die Kombination aus NPS2143 und Calcium hatten keine Auswirkung auf den Aktivitätszustand von Paxillin. **B.** Bei den unbehandelten WT-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass sie nur etwa ein Drittel der Kontrollzell-Aktivität von SHC aufwiesen. Die Leervektor-transfizierten 786-O-Zellen zeigten nach Behandlung mit NPS2143 eine leichte Reduktion der Aktivität von SHC um 40 %. Bei den Calcium-behandelten Klonen der CaSR-exprimierenden Zellen wurde eine Aktivitätssteigerung um annähernd 75 % nachgewiesen werden. Durch die zusätzliche Behandlung mit NPS2143 wurde der Effekt aufgehoben. Die Kombinationsbehandlung mit Cinacalcet + Calcium zeigte ein noch höheres Aktivitätslevel von SHC, als die Calcium-Behandlung. Alle Werte wurden in Relation zur Kontrolle (pcDNA3 Ko = 100 %) gesetzt.

3.2.4.7 Proteinmenge von phospho Paxillin (Y418) und phospho SHC (Y239/240) der CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen

Wie bereits für die transfizierten Zellen der Linie 786-O durchgeführt, wurden auch Aktivitätsanalysen der Proteine Paxillin und SHC an den transfizierten HEK-293-Zellen vorgenommen. In den Leervektor-transfizierten Zellen kam es durch die Kombinationsbehandlung mit NPS2143 und Calcium zu einer Aktivitätsverminderung von Paxillin um etwa 50 %. Bei den CaSR-exprimierenden Zellen wurde bereits in den unbehandelten Zellen eine Steigerung der Aktivität um 200 % im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen gemessen. Eine Behandlung mit Calcium führte zu einem Messwert von 730 % im Vergleich zu den Kontrollen. Durch die zusätzliche Behandlung mit NPS2143 wurde dieser Effekt wieder umgekehrt. Eine Behandlung mit NPS2143 hatte keine Auswirkungen auf die Aktivität von Paxillin. Die Kombinationsbehandlung mit Cinacalcet und Calcium führte wieder zu einem deutlichen Aktivitätszuwachs (+ 365 %), der das Niveau der Calcium-Behandlung aber nicht erreichte (Abbildung 46 A). Bei den Leervektor-transfizierten Zellen zeigte sich im Protein SHC eine Aktivitäts-Reduktion von ca. 50 % nach Calcium-Behandlung. Die gleiche Behandlung führte in den CaSR-exprimierenden Zellen zu einem deutlichen Aktivitätszuwachs um mehr als 400 %. Durch die zusätzliche Behandlung mit NPS2143 wurde dieser Effekt erneut umgekehrt. Mit einer Steigerung von 330 % im Vergleich zu den Kontrollen erreichte die Aktivität von SHC nach Cinacalcet- und Calcium-Behandlung nicht mehr das Niveau der Calcium-Behandlung (Abbildung 46 B). Alle Werte wurden in Bezug auf die unbehandelten Leervektor-Kontrollen (pcDNA3 Ko = 100 %) gesetzt.

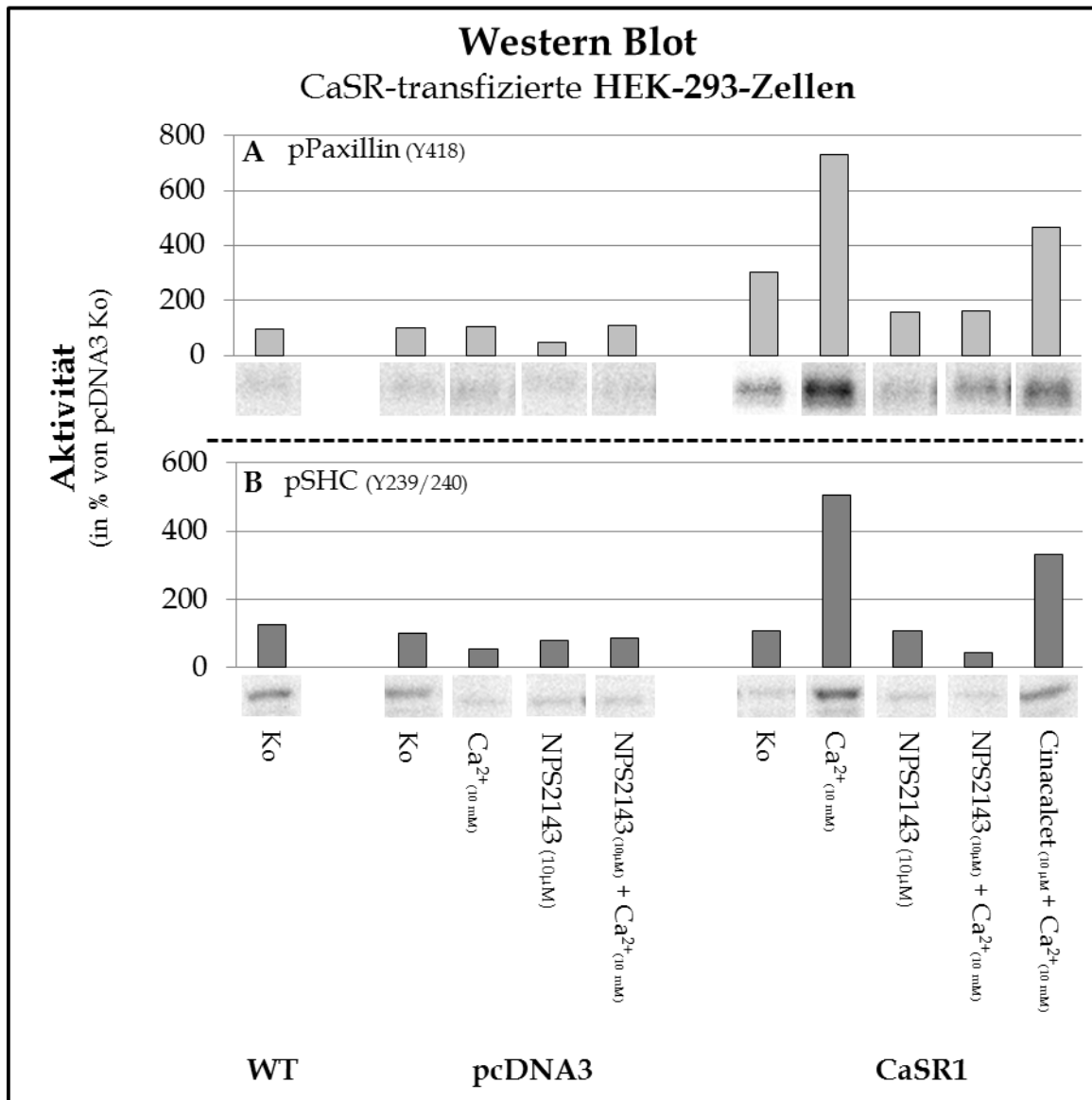


Abbildung 46: Western Blot von phospho Paxillin und phospho SHC der CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min.), NPS2143 (10 μM - 1 Std.) oder Cinacalcet (10 μM - 1 Std.) bzw. Kombinationen daraus. A. Die Leervektor-transfizierten HEK-293-Zellen zeigten lediglich auf die Kombinationsbehandlung mit NPS2143 + Calcium eine Reaktion in Form einer leichten Reduktion der Aktivität von Paxillin. Die Zellen des Klons CaSR1 hingegen zeigten schon ohne Behandlung eine höhere Aktivität der Kinase Paxillin (+ 200 %) im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Behandlung mit Calcium steigerte die Aktivität auf einen Maximalwert von 730 %. Dieser Wert wurde durch die zusätzliche Verwendung von NPS2143 wieder auf Kontrollniveau gesenkt. Die Kombinationsbehandlung aus Cinacalcet + Calcium führte im Vergleich zu den Kontrollen wieder zu einem Anstieg der Aktivität, die aber deutlich unter dem Wert der Calcium-Behandlung lag. **B.** Die Leervektor-transfizierten Zellen reagierten auf eine Calcium-Behandlung mit um die Hälfte verringerter Aktivität der Kinase SHC. Die Kombinationsbehandlungen hatten keinen Einfluss. Die CaSR-transfizierten Zellen des Klons CaSR zeigten bei Behandlung mit Calcium eine große Aktivitätssteigerung um 405 % im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen, die durch weitere Behandlung mit NPS2143 wieder aufgehoben wurde. Die Behandlung mit Cinacalcet + Calcium führte zu einer Aktivitätssteigerung um 230 %. Alle Werte wurden in Relation zu den Kontrollzellen (pcDNA3 Ko = 100 %) gesetzt.

3.2.4.8 Proteinmenge von phospho SRC (Y419) und phospho CREB (S133) der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen

Die WT-Zellen zeigten deutlich weniger SRC-Aktivität als die Leervektor-transfizierten Zellen. Bei den Leervektor-transfizierten Zellen führte keine Behandlung zu einer bemerkenswerten Änderung der SRC-Aktivität. Im Gegensatz dazu zeigte die Behandlung mit Calcium, bzw. die Kombinationsbehandlung aus Cinacalcet und Calcium eine starke Verminderung der Aktivität um jeweils ca. 65 % im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 47 A). Die Analyse der Aktivitätszustände des Transkriptionsfaktors CREB zeigte in den Leervektor-transfizierten Zellen bei keiner Behandlung eine Auswirkung auf die Aktivität. Bei den CaSR-exprimierenden Zellen des Klons CaSR1 wurde nach Calcium-Behandlung eine Aktivitätssteigerung um 45 % relativ zu den Kontrollen gemessen. Die Kombinationsbehandlung mit Cinacalcet und Calcium hingegen führte zu einer leichten Reduktion der Aktivität um 23 % (Abbildung 47 B). Alle Werte wurden in Relation der unbehandelten Leervektor-Kontrolle (pcDNA3 Ko = 100 %) gesetzt.

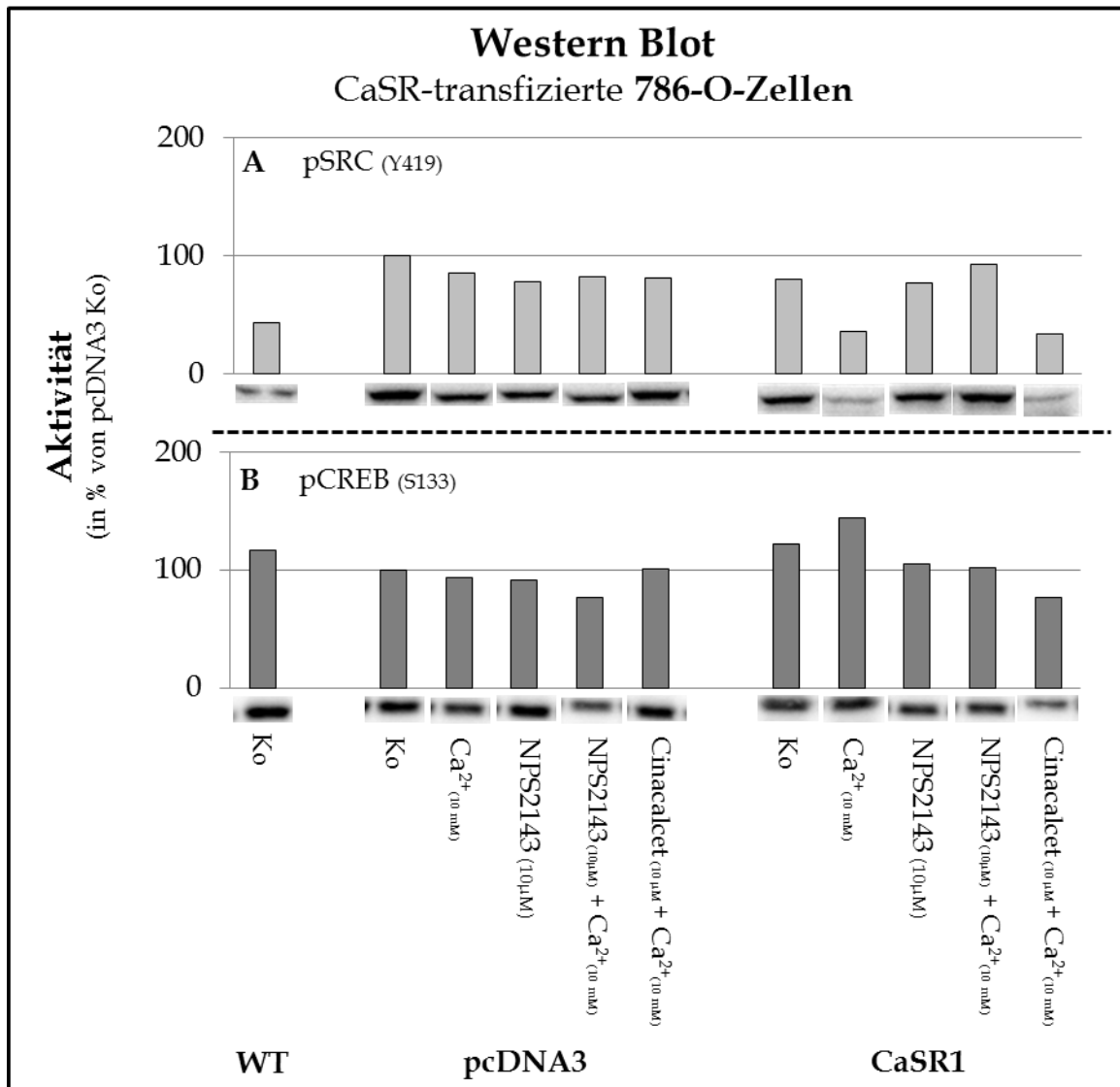


Abbildung 47: Western Blot von phospho SRC und phospho CREB der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min.), NPS2143 (10 μM - 1 Std.) oder Cinacalcet (10 μM - 1 Std.) bzw. Kombinationen daraus. A. Die unbehandelten WT-Zellen zeigten im Vergleich zu den Leervektor-transfizierten Kontrollzellen eine deutlich verminderte Aktivität von SRC. In den Leervektor-transfizierten Zellen hatte jede Behandlung nur geringe Auswirkungen auf das Aktivitätsniveau. Eine Behandlung mit Calcium, bzw. der Kombination aus Cinacalcet + Calcium führte in den CaSR-exprimierenden Zellen des Klons CaSR1 zu einer deutlichen Abnahme der SRC-Aktivität, die sich im Bereich von etwa je 65 % abspielte. **B.** Die Behandlungen der Leervektor-transfizierten Zellen, zeigte nur geringfügige Änderungen im Aktivitätsniveau von CREB. Durch die Behandlung mit Calcium konnte die Aktivität in den CaSR-exprimierenden Klonen um 45 % im Vergleich zu den Kontrollzellen gesteigert werden. Alle Werte wurden in Relation zur Kontrolle (pcDNA3 Ko = 100 %) gesetzt.

4 Diskussion

4.1 Die knochenspezifische Metastasierung

Die Problematik einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung, die bei fast allen Entitäten auftritt, ist die Ausbildung von Fernmetastasen. Beim NZK ist speziell die Ausbildung von Knochenmetastasen von verheerender Natur geprägt, da diese nicht heilbar sind und zu einer signifikanten Abnahme der Lebensdauer der Betroffenen führen können. Warum es in den einzelnen Tumorentitäten zu unterschiedlichen und z.T. organspezifischen Metastasierungsmustern kommt, konnte bis heute nicht abschließend geklärt werden, obwohl bereits viele Mechanismen der Metastasierung einzelner Tumorentitäten als bekannt gelten (Vanharanta et al., 2013). Nach aktuellem Forschungsstand beruht der komplette Metastasierungsprozess nicht ausschließlich auf den Eigenschaften der disseminierten Tumorzellen, sondern auf einem Zusammenspiel zwischen Tumorzellen und umgebenden Milieu (Langley and Fidler, 2011; Paget, 1889). Neben intrazellulären Eigenschaften sowie dem nötigen Arrangement an Oberflächenproteinen und -rezeptoren kommt es demnach auf die Beschaffenheit sämtlicher Organe und Gewebe, die am Metastasierungsschritt beteiligt sind, an. So sind bereits die Zellen bei Disseminierung aus dem Primärtumor auf wichtige Zellvorgänge wie Migration und Adhäsion angewiesen. Nach Wanderung durch die Blutbahn, bzw. lymphatischen Gefäße kommt es entweder aufgrund der räumlichen Beschaffenheit der feinen Kapillaren zum Stopp der Zirkulation oder via Transmitter-/Rezeptorerkennung zur Adhäsion an den Gefäßwänden. Dort wandern die Tumorzellen durch die Endothel(zell)schicht in die sie umliegenden Organe. Gerade die Knochen bieten dabei aufgrund ihrer Beschaffenheit ideale Voraussetzungen zur Etablierung von Fernmetastasen. Auf der einen Seite beherbergt das Knochengewebe feine Fenestrierungen, die es den disseminierten Tumorzellen erleichtert den Knochen zu infiltrieren (Nguyen et al., 2009). Auf der anderen Seite bietet die ständig von Umstrukturierungen geprägte Knochenmatrix ideale Voraussetzungen, die Migration zur und Adhäsion an der Knochenhaut zu erleichtern (van Driel and van Leeuwen, 2014). Durch den ständig stattfindenden Metabolismus der Knochen werden neben verschiedenen Wachs-

tumsfaktoren auch große Mengen an Calcium-Ionen freigesetzt, die schon seit geraumer Zeit in Kombination mit einer erhöhten CaSR-Expression mit der Knochenmetastasierung anderer Tumorentitäten, wie dem Prostata- oder Mammakarzinom, in Zusammenhang gebracht werden konnten (Riccardi et al., 2009; Shui et al., 2013). Auch beim NZK wurden im letzten Jahr in der Urologie der Universitätsmedizin Mainz ähnliche Ergebnisse erzielt. Hierbei korrelierte eine erhöhte Expression an CaSR-Molekülen in verschiedenen primären Nierenkarzinomzellen mit der Metastasierung in die Knochen (Jöckel et al., 2014). Zur Fortführung der Untersuchungen nahm die Fragestellung, ob und wie weit eine Überexpression des CaSR in Nierenkarzinomzellen pro-metastatische Folgen auf die Zellen haben kann, eine zentrale Rolle ein.

Zur Klärung der Frage einer Beteiligung des CaSR an der knochenspezifischen Metastasierung des NZK wurden 786-O- und HEK-293-Zellen mit einem CaSR-Konstrukt transfiziert.

4.1.1.1 Eine Überexpression des CaSR führt zu leichten Unterschieden pro-metastatischer Eigenschaften

Der CaSR ist ein Oberflächenmolekül der GPCR-Familie und kann neben seinem Hauptliganden Calcium eine Reihe anderer Moleküle und Modulatoren erkennen (Riccardi, 2002). Entscheidend für die intrazelluläre Signalweiterleitung und somit auch Effektgenerierung ist, wie bei vielen anderen Rezeptoren, die Aktivierung mittels Phosphorylierung an bestimmten Aminosäureresten. Interessanterweise konnten bei den CaSR-transfizierten Zellen bereits ohne Aktivierung leichte Effekte in Bezug auf pro-metastatische Eigenschaften nachgewiesen werden. So zeigten die CaSR-transfizierten 786-O-Zellen eine leicht erhöhte Adhäsion an Fibronectin und an Kollagen I, was bereits einen Hinweis darüber liefert, dass es sich bei den hier erhobenen Daten um ein durch CaSR-beteiligtes Phänomen handeln könnte, da sich die Zellen nur in punkto Transfektion des CaSR von den Kontrollzellen unterschieden. Ein ähnliches Muster zeigten die Zellen ebenfalls bzgl. der Adhäsion an Endothelzellen. Des Weiteren konnte für beide CaSR-transfizierten Zelllinien

(786-O und HEK-293) eine enorme Steigerung des Migrationspotentials bei Verwendung von Fibronectin als Chemotaxin nachgewiesen werden (Tabelle 12). Ein möglicher Grund für diese Ergebnisse könnte die Eigenschaft des CaSR sein, sich mit Matrix-Bindeproteinen der Integrin-Familie auf der Zelloberfläche zu Proteinkomplexen zu clustern (Tharmalingam et al., 2011). Integrine gehören zu den Transmembranproteinen und sind in der Lage mit ihrer extrazellulären Domäne die RGD (Arginin, Glycin, Asparaginsäure)-Sequenz von EZM-Bestandteilen, bspw. Fibronectin und Kollagen, zu erkennen und zu binden. Durch die Komplexbildung mit Integrinen kommt es folglich zu einer koordinierteren Zellmigration und -Adhäsion, die durch eine Aktivierung des CaSR noch weiter forciert werden kann.

Eine weitere Erklärung für die gesteigerte Migration und Adhäsion bereits ohne Calcium-Einfluss besteht durch eine mögliche und ungewollte Aktivierung des CaSR durch nicht definierte Inhaltsstoffe im eingesetzten Medium *AmnioMax C100 Basal Medium*. Obwohl es sich laut Herstellerangaben um ein *low Calcium*-Medium handelt, könnten neben Spuren von Calcium auch andere Stoffe wie trivalente Kationen oder L-Aminosäuren enthalten sein, welche die Aktivierung des CaSR triggern (www.Invitrogen.com) (Brauner-Osborne et al., 2007; Liou et al., 2011).

Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse der Migrations- und Adhäsions-Analysen der CaSR-transfizierten Zellen ohne Behandlung. Die Pfeile stehen für Erhöhungen im Vergleich zu den Leervektor-transfizierten Kontrollen. ↑ = Erhöhung, ↑↑↑ = sehr starke Erhöhung, O = keine Veränderung.

Ohne Behandlung	CaSR-expr. 786-O-Zellen	CaSR-expr. HEK-293-Zellen
Migration (Fibronectin)	↑↑↑	↑↑↑
Adhäsion an EZM	↑	O
Adhäsion an Endothel	↑	O

4.1.1.2 Calcium verstärkt die wichtigsten Schritte einer knochenspezifischen Metastasierung bei CaSR-transfizierten Nierenkarzinomzellen

Die bereits angesprochenen Schlüsselvorgänge der Metastasierung wie Migration, Adhäsion und schließlich Proliferation begünstigen, wie auch bei anderen Tumor-entitäten, die organspezifische Metastasierung beim NZK. Um die knochenspezifische Metastasierung mit Hinblick auf den CaSR genauer zu untersuchen, wurden die genannten Vorgänge an Zellkulturmodellen simuliert. Durch den Einsatz verschiedener Stoffe, wie den EZM-Bestandteilen Fibronectin, diverser Kollagene oder auch Calcium, konnten die Versuche unter Knochenmilieu-ähnlichen Zuständen durchgeführt werden. Um die Effekte eindeutig der Calcium-Behandlung zuordnen zu können, wurden die Zellen mit Calcium und zusätzlich mit NPS2143, einem potenten CaSR-Inhibitor, behandelt.

4.1.1.2.1 Calcium erhöht die Adhäsion CaSR-transfizierter Nierenkarzinomzellen

Eine Behandlung mit Calcium (10 mM) führte in den transfizierten 786-O-Klonen zu einer starken Adhäsion an Fibronectin und Kollagen I (Tabelle 13). Fibronectin und Kollagen I sind beides Bestandteile des Knochens und werden bei Umbauprozessen während des Knochenmetabolismus freigesetzt (Boot-Handford et al., 2003; Mundy et al., 1993). Die nachgewiesene, starke Adhäsion zeigt in diesem Fall, dass die CaSR-transfizierten 786-O-Zellen in der Lage sind an Strukturen zu binden, die ein knochenähnliches oder gleiches Milieu aufweisen und somit entscheidend in die knochenspezifische Metastasierung einwirken können. Tharmalingam et al. fanden 2011 heraus, dass der CaSR in der Lage ist Proteinkomplexe mit benachbarten Integrinen einzugehen. Die Aktivierung des CaSR mit Hilfe von Calcium führte dabei zu einer Aktivierung der Zellen, die neben einer intrazellulären Calcium-Sekretion auch die Regulation verschiedener Signalwege auslöste, welche zu weiterer Integrin-CaSR-Komplexierung und schließlich gesteigerter Migration und Adhäsion führte (Tharmalingam et al., 2011).

Durch die Kombinationsbehandlung der Zellen mit NPS2143 und Calcium konnte der Effekt der gesteigerten Adhäsion an EZM-Komponenten weitestgehend

aufgehoben werden (Tabelle 13). Dies belegt, dass der CaSR für die erhöhte Adhäsion verantwortlich ist. NPS2143 ist ein *Calcilytic* und dient als Antagonist des CaSR, indem es den CaSR blockiert und somit den Anstieg zytoplasmatischer Calcium-Konzentration inhibiert. Als ein allosterischer Modulator ist NPS2143 in der Lage die sieben α -Helices umfassende transmembrane Domäne des CaSR zu erkennen und dabei die davon abgehenden Aminosäurereste zu blockieren (Jensen and Brauner-Osborne, 2007). Durch die Verwendung des Antagonisten bleibt die Aktivierung des CaSR aus. Somit wird die intrazelluläre Signalweiterleitung bzw. Ausschüttung des zytoplasmatischen Calcium-Vorrats unterdrückt und die Adhäsion an Komponenten der EZM entspricht dem Niveau der Kontrollzellen.

Die von Tharmalingam et al 2011 durchgeführten Experimente am medullären Schilddrüsenkarzinom zeigten ein ähnliches Ergebnis, obgleich ein anderer Inhibitor (NPS89636) für die Blockierung des CaSR eingesetzt wurde. Der CaSR führte hierbei nach Aktivierung zu gesteigerter Zell-Adhäsion und -Migration, die durch zusätzliche Verwendung des CaSR-Inhibitors aufgehoben werden konnte.

Tabelle 13: Übersicht über die Ergebnisse der Adhäsion CaSR-transfizierter 786-O-Zellen an Komponenten der EZM nach verschiedenen Behandlungen. Die Werte sind in Prozent der Kontrollwerte (unbehandelte Zellen) angegeben. Die Daten zu den CaSR-exprimierenden Klonen wurden gemittelt und alle Daten in Bezug auf die unbehandelten Zellen dargestellt.

EZM - Komponente	786-O	Ca²⁺	NPS2143 + Ca²⁺
Fibronektin	pcDNA3	93	87
	CaSR-expr. Klone	253	111
Kollagen I	pcDNA3	128	114
	CaSR-expr. Klone	329	130
Kollagen IV	pcDNA3	99	96
	CaSR-expr. Klone	74	83
BSA	pcDNA3	109	95
	CaSR-expr. Klone	80	83

Die CaSR-transfizierten 786-O-Zellen zeigten nach Calcium-Behandlung eine sehr starke Zunahme des Adhäsionspotentials. Der Effekt konnte wiederum durch die Kombinationsbehandlung mit NPS2143 und Calcium umgekehrt werden (Tabelle 14). Hills et al. konnten 2012 zeigen, dass die Aktivierung des CaSR in beta-Zellen des Pankreas zu einer starken Expression von Cadherinen auf der Zelloberfläche führte und das Adhäsionspotential der Zellen zunahm (Hills et al., 2012). Allerdings sind Cadherine in Tumorzellen generell reduziert exprimiert, da diese einen wichtigen Baustein in der Disseminierung vom Primärtumor darstellen. Die Gruppe um Satcher et al. zeigte jedoch kürzlich, dass 786-O-Zellen, die in SCID (*severe combined immunodeficiency*)-Mäuse injiziert wurden, um die knochenspezifische Metastasierung zu untersuchen, eine starke Expression an Cadherin-11-Molekülen

aufwiesen. Diese Zellen wurden neun Wochen nach der Injektion aus den Knochenmetastasen der Mäuse entnommen und quantitativ ausgewertet. Cadherin-11 wird normalerweise sehr stark von Osteoblasten exprimiert und ist für die Calcium-abhängige Zell-Zell-Adhäsion zuständig (Satcher et al., 2014). Eine Cadherin-11-Expression der CaSR-transfizierten 786-O Zellen, welche die Adhäsion an Endothelzellen beeinflusst, wäre in diesem Fall denkbar. Eine Injektion der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen in das gleiche Mausmodell könnte zeigen, ob der CaSR-Rezeptor in Kombination mit der hohen Calcium-Konzentration, die in den Knochen vorherrscht, die Metastasierungsschritte forciert.

Tabelle 14: Übersicht über die Ergebnisse der Adhäsion CaSR-transfizierter 786-O-Zellen an HUVEC (Endothel) nach verschiedenen Behandlungen. Die Werte sind in Prozent der Kontrollwerte (unbehandelte Zellen) angegeben. Die Daten zu den CaSR-exprimierenden Klonen wurden gemittelt und alle Daten in Relation zur Kontrolle (pcDNA3 unbehandelt) ausgewertet.

Adhäsion (Endothel)	unbehandelt	Ca²⁺	NPS2143 + Ca²⁺
pcDNA3	100	109	79
CaSR-expr. Klone	119	533	90

Die CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen zeigten im Vergleich zu den transfizierten NZK-Zellen sowie den Kontrollen deutlich weniger Adhäsion an Fibronectin bzw. Kollagen I (Tabelle 15). Eine Adhäsion der HEK-293-Zellen an HUVEC konnte nicht nachgewiesen werden. Der Grund für die schwache Adhäsion der HEK-293-Zellen ist möglicherweise die Tatsache, dass es sich bei den Zellen nicht um Tumorzellen handelt und diese nur bedingt pro-metastatische Eigenschaften aufweisen. Auch in anderen Arbeitsgruppen, die Versuche an HEK-293-Zellen durchgeführt haben, zeigten die Zellen deutliche Defizite in der Adhäsion, die auf ein schlecht ausgeprägtes Aktin-Zytoskelett sowie die mangelnde Ausbildung von Integrin-Proteinkomplexen zurückzuführen ist (Papp et al., 2008).

Wie bereits bei Beschreibung der Zellkultur bemerkt wurde, zeigten alle HEK-293-Zellen (WT und alle transfizierten Klone) nur semi-adhärenente Eigenschaften auf der Oberfläche der Zellkulturflasche. Bereits leichte Erschütterungen führten zum partiellen Ablösen des Monolayers. Möglicherweise reichte die geminderte Adhäsionskraft der Zellen nicht aus, um eine Bindung an einen HUVEC-Monolayer zu gewährleisten bzw. kam es dadurch nur zu verminderter Adhäsion an Komponenten der EZM.

Tabelle 15: Übersicht über die Ergebnisse der Adhäsion CaSR-transfizierter HEK-293-Zellen an Komponenten der EZM nach verschiedenen Behandlungen. Die Werte sind in Prozent der Kontrollwerte (unbehandelte Zellen) angegeben. Die Daten zu den CaSR-exprimierenden Klonen wurden gemittelt und alle Daten in Relation zur Kontrolle (je pcDNA3 unbehandelt) ausgewertet.

EZM - Komponente	HEK-293	Ca²⁺	NPS2143 + Ca²⁺
Fibronektin	pcDNA3	79	90
	CaSR-expr. Klone	165	66
Kollagen I	pcDNA3	71	81
	CaSR-expr. Klone	75	92
Kollagen IV	pcDNA3	137	130
	CaSR-expr. Klone	113	126
BSA	pcDNA3	70	68
	CaSR-expr. Klone	71	92

4.1.1.3 Calcium erhöht das Migrationspotential CaSR-transfizierter Nierenkarzinomzellen

Ähnlich wie in den Adhäsionsversuchen manifestierte sich in den Migrationsanalysen der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen eine deutliche Steigerung des Potentials nach Calcium-Behandlung. Konsistent mit diesen Ergebnissen konnte bereits 2009 die Arbeitsgruppe um Saidak et al. zeigen, dass der CaSR die Metastasierung in den Knochen beim Mammakarzinom entscheidend fördert. Hierbei wurde Calcium in aufsteigenden Konzentrationen in Migrationsanalysen eingesetzt und die Daten der gesteigerten Migration von Mammakarzinom-Zelllinien ausgewertet (Saidak et al., 2009). 2014 konnte im Labor der Urologie Mainz gezeigt werden, dass Nierenkarzinomzellen aus Patienten, die innerhalb von fünf Jahren nach Nephrektomie Knochenmetastasen sowie eine signifikant erhöhte Expression des CaSR aufwiesen, ein signifikant höheres Migrationspotential im Vergleich zu nicht-metastasierenden Kontrollzellen hatten (Jöckel et al., 2014). Der zugrundeliegende Mechanismus könnte hierbei erneut der bereits diskutierten Eigenschaft des CaSR geschuldet sein einen Proteinkomplex mit speziellen Vertretern der Integrin-Familie einzugehen und somit die Migration zu fördern (Tharmalingam et al., 2011). Die intrazellulären Signalwege, die daran beteiligt sind, werden in Abschnitt 3.2.4 genauer erläutert. Die in Tabelle 16 zusammengefassten Ergebnisse der Migration zeigen unter anderem erneut, dass die Kombinationsbehandlung aus NPS2143 und Calcium zu einer Umkehr des durch Calcium-verursachten Effekts führte. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelang die Gruppe um Hernández-Bedolla et al. 2015 bei chemotaktischen Analysen an Mammakarzinomzellen nach Einsatz des gleichen CaSR-Inhibitors (Hernandez-Bedolla et al., 2015).

Tabelle 16: Darstellung der Ergebnisse der Migration (Chemotaxin Calcium) nach Behandlung der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen. Die Werte sind in Prozent der Kontrollwerte (unbehandelte Zellen) angegeben. Die Daten zu den CaSR-exprimierenden Klonen wurden gemittelt und alle Daten in Relation zur Kontrolle (pcDNA3 unbehandelt) ausgewertet.

Migration (Calcium)	unbehandelt	Ca ²⁺	NPS2143 + Ca ²⁺
pcDNA3	100	58	66
CaSR-expr. Klone	93	3632	114

4.1.1.4 Calcium nimmt Einfluss auf die Proliferation CaSR-transfizierter Zellen

Die Proliferation ist der abschließende Prozess der Metastasierung, da erst durch Zellvermehrung eine Mikrometastase zu einer Makrometastase ausreifen kann. Zur Proliferation benötigt die Zelle neben einem geeigneten Milieu auch Nährstoffe und Wachstumsfaktoren. Das Knochen-Mikromilieu bietet hierfür den optimalen Nährboden, da durch Umbau der Knochen neben Wachstumsfaktoren wie TGF- β und VEGF, vor allem Calcium-Ionen freigesetzt werden. In den hier durchgeführten Versuchen zeigten beide CaSR-transfizierten Zelllinien eine erhöhte Proliferationsrate nach Calcium-Behandlung (10 mM - 30 Min.) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Tabelle 17). Die Daten bzw. Interpretationen anderer Arbeitsgruppen können im Fall der Proliferation nicht direkt auf die hier erhobenen Daten übertragen werden, da abhängig vom Gewebetyp eine Proliferation des CaSR teilweise gefördert, teilweise inhibiert wurde. In den glatten Muskelzellen der Arterie bei Ratten und bei β -Zellen des Pankreas kommt es nach Aktivierung des CaSR zu einer verstärkten Proliferation der Zellen (Hills et al., 2012; Li et al., 2011). Eine Reduktion der Proliferationsrate nach Calcium-Stimulation des CaSR konnte hingegen in Neuroblastom-Zellen beobachtet werden (Casala et al., 2013). Obwohl der CaSR an der Tumorgenese und Metastasierung diverser Tumorentitäten wie Ovarial- oder Mammakarzinom nachweislich beteiligt ist, kann er nicht ausschließlich als Onkogen betrachtet werden (Chakravarti et al., 2009). Im Darm ist eine Suppression des CaSR mit erhöhtem Kolorektal-Karzinom-Risiko via gesteigerter

Proliferation und Differenzierung assoziiert (Aggarwal et al., 2014). Da die in dieser Arbeit eingesetzten CaSR-transfizierten Nierenkarzinomzellen nach Calcium-Behandlung mit gesteigerter Proliferation reagierten, muss davon ausgegangen werden, dass die Auswirkungen einer Stimulation der Zellen via CaSR pro-metastatische Effekte zur Folge hat. Die Auswirkungen der CaSR-Transfektion in den HEK-293-Zellen sind in diesem Fall als marginal zu betrachten, da diese ursprünglich aus gesundem Gewebe extrahiert wurden und dementsprechend keine metastatischen Eigenschaften zeigen sollten.

Tabelle 17: Darstellung der Ergebnisse der Proliferation der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen nach unterschiedlichen Behandlungen. Die Werte sind in Prozent der Kontrollwerte (unbehandelte Zellen) angegeben. Die Daten zu den CaSR-exprimierenden Klonen wurden gemittelt und alle Daten in Relation der Kontrolle (je pcDNA3 unbehandelt) ausgewertet.

Proliferation	786-O	Ko	Ca²⁺	NPS2143 + Ca²⁺
786-O	pcDNA3	100	103	42
	CaSR-expr. Klone	100	159	82
HEK-293	pcDNA3	100	107	63
	CaSR-expr. Klone	106	138	66

4.1.1.5 Calcium fördert die knochenspezifische Metastasierung durch Aktivierung des AKT-Signalwegs (zelltypspezifisch)

In den Zellen konnten mehrere intrazelluläre Kinasen identifiziert werden, die auch in einer großen Zahl anderer Tumorentitäten wichtige Schlüsselmoleküle der Tumorgenese und Metastasierung darstellen.

Eines dieser Schlüsselproteine ist die Kinase AKT. Durch die Behandlung mit Calcium konnte die Menge an aktivierten AKT-Molekülen deutlich gesteigert

werden (Tabelle 18 und Tabelle 19). Dieser Effekt konnte an zwei unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung an Threonin 308 erfolgt nach Membranrekrutierung durch die PDK1, während die Phosphorylierung an Serin 473 mit Hilfe des mTORC2-Komplexes oder aber der DNA-PK (*DNA-activated protein kinase*) bewirkt wird (Bu et al., 2008; Xue et al., 2013). Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung besteht durch einen positiven *Feedbackloop*, der nach einer Primärphosphorylierung von AKT durch die Aktivierung des TORC1 gestartet wird und schließlich die PI3K-Aktivität erhöht (Abbildung 48). Dies führt zur verstärkten Phosphorylierung an Threonin 308 (Miedlich et al., 2004). Nach Aktivierung ist AKT in der Lage über verschiedene Signalwege das Zellwachstum, die Differenzierung und das Zellüberleben gravierend zu beeinflussen (Bu et al., 2008). Angewendet auf die hier erhobenen Ergebnisse fördert die Behandlung mit Calcium via AKT-Signalweg die Metastasierungsfähigkeit der CaSR-exprimierenden NZK-Klone, indem es die Proliferation, die Adhäsion und die Migration induziert. Eine erhöhte AKT-Aktivität, die durch die Calcium-induzierte Aktivierung des CaSR ausgelöst wurde, führte auch bereits in Prostatakarzinomzellen zu gesteigerter Adhäsion (Liao et al., 2006).

Wie auch bei den vorangegangenen funktionellen Analysen festgestellt wurde, führte eine Kombinationsbehandlung mit NPS2143 (10 μ M - 1 Std.) + Calcium (10 mM - 30 Min.) bei den Analysen der Signalwege zu einer Umkehrung der Effekte, die durch die alleinige Calcium-Behandlung hervorgerufen wurden. Dies spricht dafür, dass die, durch die Calcium-Behandlung hervorgerufenen Effekte tatsächlich auf der Transfektion des CaSR bzw. dessen Aktivierung beruhen, da die Behandlung mit NPS2143 sonst keinen Einfluss darauf gezeigt hätte.

Tabelle 18: Einfluss einer erhöhten CaSR-Expression auf intrazelluläre Signalwege (Phospho Kinase-Array) nach unterschiedlicher Behandlung (Ko; Ca²⁺ (10 mM - 30 Min.); NPS2143 (10 µM - 1 Std.) + Ca²⁺; Cinacalcet (10 µM - 1 Std.) + Ca²⁺). Die Werte sind in Prozent angegeben. Die einzelnen Werte wurden gemittelt und alle Daten in Relation zur jeweiligen Kontrolle (unbehandelt) dargestellt (HM = Medium ohne Serum).

Kinase-Array	786-O pcDNA3				786-O CaSR1			
	HM	Ca ²⁺	NPS 2143 +Ca ²⁺	Cinacalcet +Ca ²⁺	HM	Ca ²⁺	NPS 2143 +Ca ²⁺	Cinacalcet +Ca ²⁺
AKT1/2/3 (T308)	100	94	84	91	100	249	193	146
ERK1/2 ((T202/Y204)/(T185(Y187)))	100	127	107	120	100	174	71	125
JNK pan (T183/Y185)/(T221/Y223)	100	112	108	108	100	228	112	317
P38α (T180/Y182)	100	111	82	89	100	146	43	204
CREB (S133)	100	125	110	110	100	150	72	237
C-Jun (S63)	100	103	103	119	100	210	88	298

Tabelle 19: Einfluss einer erhöhten CaSR-Expression auf intrazelluläre Signalwege (Western Blot der Zelllinie 786-O) nach unterschiedlicher Behandlung (Ko; Ca²⁺ (10 mM - 30 Min.); NPS2143 (10 µM - 1 Std.) + Ca²⁺; Cinacalcet (10 µM - 1 Std.) + Ca²⁺). Die Werte sind in Prozent angegeben. Die einzelnen Werte wurden gemittelt und alle Daten in Relation zur jeweiligen Kontrolle (unbehandelt) dargestellt (HM = Medium ohne Serum).

Expression/ Aktivität	786-O Transfektions-Kontrollen				CaSR-exprimierende Klone			
	HM	Ca ²⁺	NPS 2143 +Ca ²⁺	Cina- calcet +Ca ²⁺	HM	Ca ²⁺	NPS 2143 +Ca ²⁺	Cina- calcet +Ca ²⁺
AKT	100	104	118	111	93	89	76	65
pAKT (S473)	100	77	136	142	127	206	125	193
ERK	100	91	82	73	64	66	83	85
pERK1/2 (T1202/Y204/ T185(Y187))	100	72	83	90	172	270	159	247
pSAP/ JNK (T183/Y185)	100	111	132	139	278	563	203	538
pP90RSK (S380)	100	47	81	66	121	222	97	233
pSRC (Y419)	100	86	83	81	80	36	93	34
pCREB (S133)	100	80	109	97	66	110	69	107
pPaxillin (Y418)	100	73	80	99	106	104	86	133
pSHC (Y239/240)	100	94	77	101	154	224	50	139

In CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen führte die Behandlung mit Calcium zu keiner nennenswerten Änderung an aktivierten AKT-Molekülen, obwohl der AKT-Signalweg als wichtiger Vertreter bei den CaSR-transfizierten 786-O-Zellen charakterisiert werden konnte. Diesen Ergebnissen können mehrere Ursachen zu Grunde liegen. Zum einen handelt es sich bei den HEK-293-Zellen um Zellen epithelialen Ursprungs, die aus einer gesunden embryonalen Niere stammen und nicht, wie die Nierenkarzinom-Zelllinie 786-O die Fähigkeit besitzen zu metastasieren. Zum anderen zeigt die aktuelle Literatur, dass auch Arbeiten an unterschiedlichen Zelllinien, trotz gleichen Versuchsaufbaus und -durchführung zu

verschiedenen Ergebnissen führen können und somit unterstellt werden muss, dass die Effekte der CaSR-Signalweiterleitung in einigen Fällen zelltypspezifisch sind (Rauch et al., 2012).

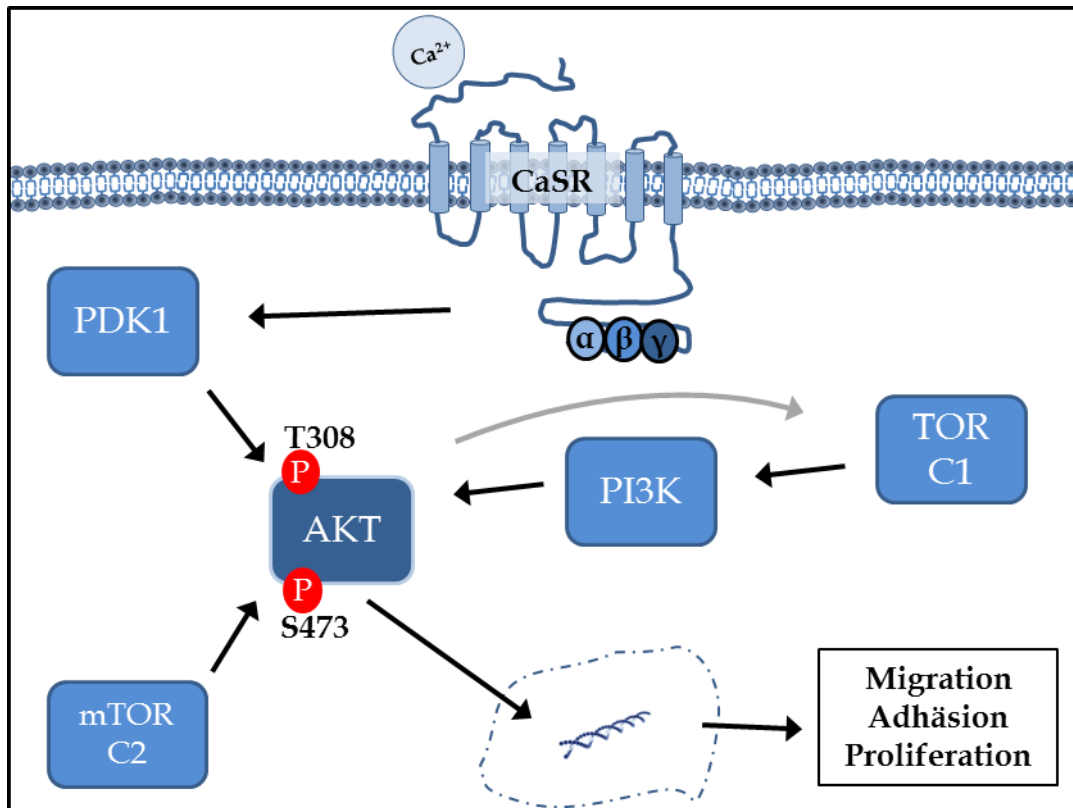


Abbildung 48: Intrazelluläre Signalwege der CaSR-transfizierten Zellen. Durch die Behandlung mit Calcium kommt es zu einer Aktivierung des CaSR auf der Oberfläche der Zellen.- Dies resultiert in der Aktivierung von PDK1, die in der Lage ist AKT an Threonin 308 zu phosphorylieren. Die Phosphorylierung des Serinrests an Position 473 erfolgt durch den mTORC2-Komplex. Durch die Aktivierung von AKT T308 kann ein positiver *Feedbackloop* resultieren, der zu einer gesteigerten AKT-Aktivität führt und wichtige Zellvorgänge wie Migration, Adhäsion und Proliferation fördert.

4.1.1.6 Calcium aktiviert den MAP-Kinase Signalweg

Der MAP-Kinase Signalweg besteht aus einer großen Anzahl verschiedener Signalmediatoren und -effektoren, die in der Lage sind die Tumorprogression, die Apoptoseregulation und die Proliferation zu beeinflussen. Hierunter zählen neben dem p38 α -Signalweg, dessen erhöhte Aktivität in der Literatur bereits mit vielen Tumorprogressen assoziiert ist, vor allem der ERK- und der JNK-Signalweg.

4.1.1.6.1 Calcium beeinflusst die Kinase ERK

In den CaSR-transfizierten Zellen war ERK nach Calcium-Behandlung erhöht aktiv. ERK dient als wichtiges Regulationsmolekül diverser Zellvorgänge, die an Proliferation, Migration und Überleben beteiligt sind, und wird über eine komplizierte Signalkaskade an zwei verschiedenen Stellen (ERK1/2) phosphoryliert und somit aktiviert (Sun et al., 2015). Dabei beginnt der Signalweg bspw. mit einer Stimulation eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors, zu denen auch der CaSR gehört. Durch die Phosphorylierung an den unterschiedlichen Threonin- und Tyrosin-Resten ((T202/Y204)/ (T185/Y187)) wird ERK schließlich aktiviert, transloziert in den Zellkern und phosphoryliert dort Transkriptionsfaktoren, welche die Proteinbiosynthese alternieren und somit Zellvorgänge entscheidend beeinflussen (Eishingdrelo et al., 2013). Lopez-Begami et al. zeigten in ihrer Arbeit von 2007, dass im Hautgewebe eine konstitutive Aktivierung des ERK-Signalwegs die Bildung des Transkriptionsfaktors c-Jun induziert und somit die Ausbildung von Melanomen fördert (Lopez-Bergami et al., 2007). Eine Behandlung mit Calcium führt des Weiteren in peripheren T-Lymphozyten zur Phosphorylierung von ERK (Li et al., 2013). Durch die Aktivierung des ERK-Signalwegs kommt es unter anderem auch zur Phosphorylierung des RSK (*Ribosomal s6 kinase*)-Komplexes, der an Prozessen der Signaltransduktion entscheidend beteiligt ist. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Calcium-Behandlung der CaSR-exprimierenden 786-O-Zellen Auswirkungen auf die Phosphorylierung der RSK-Moleküle hat und somit an den gefundenen Effekten der gesteigerten Migration, Adhäsion und Proliferation beteiligt ist. Dass dem RSK-Komplex bereits in der Vergangenheit pro-metastatische Eigenschaften nachgewiesen werden konnten, zeigen die Untersuchungen von Kang et al. 2000 sowie Arbeiten über das Mammakarzinom von Doehn et al. 2009. Zum einen wurden RSK-abhängige pro-migratorische und -invasorische Effekte auf Zellen des Kopf-Hals-Karzinoms nachgewiesen und zum anderen konnte ein Einfluss des RSK-Komplexes auf die Invasion und Motilität der entarteten Brustkrebszellen gezeigt werden (Doehn et al., 2009; Jean et al., 2000).

Nach Aktivierung des Signalwegs kommt es zur Translokation einzelner aktivierter ERK-Moleküle und des RSK-Komplexes in den Zellkern (Abbildung 49). Dort

angekommen, sind sie in der Lage entweder direkt auf die Proteinbiosynthese der Zelle Einfluss zu nehmen, oder aber Transkriptionsfaktoren wie c-Jun oder CREB zu aktivieren, welche analog wirken (Patel et al., 2008). Die in dieser Arbeit durchgeführten Phospho Kinase-Arrays mit den CaSR-transfizierten Zellen zeigten deutliche Steigerungen der Phosphorylierung von c-Jun und CREB nach Calcium-Behandlung, die allerdings in den Western Blot-Analysen nicht verifiziert werden konnten. Die Arbeitsgruppe um Jean et al. konnte zeigen, dass CREB als Vertreter der Transkriptionsfaktoren an der Invasion und am Zellüberleben beim metastasierten Melanom mitverantwortlich ist (Jean and Bar-Eli, 2000). Die erhöhte Migration, Adhäsion und Proliferation der CaSR-transfizierten Zellen nach Calcium-Behandlung lässt sich dementsprechend sowohl mit den erhobenen Daten, als auch mit der aktuellen Literatur in Einklang bringen und scheint Einfluss auf die Bildung von Tumorzellen bzw. deren Metastasierung zu haben.

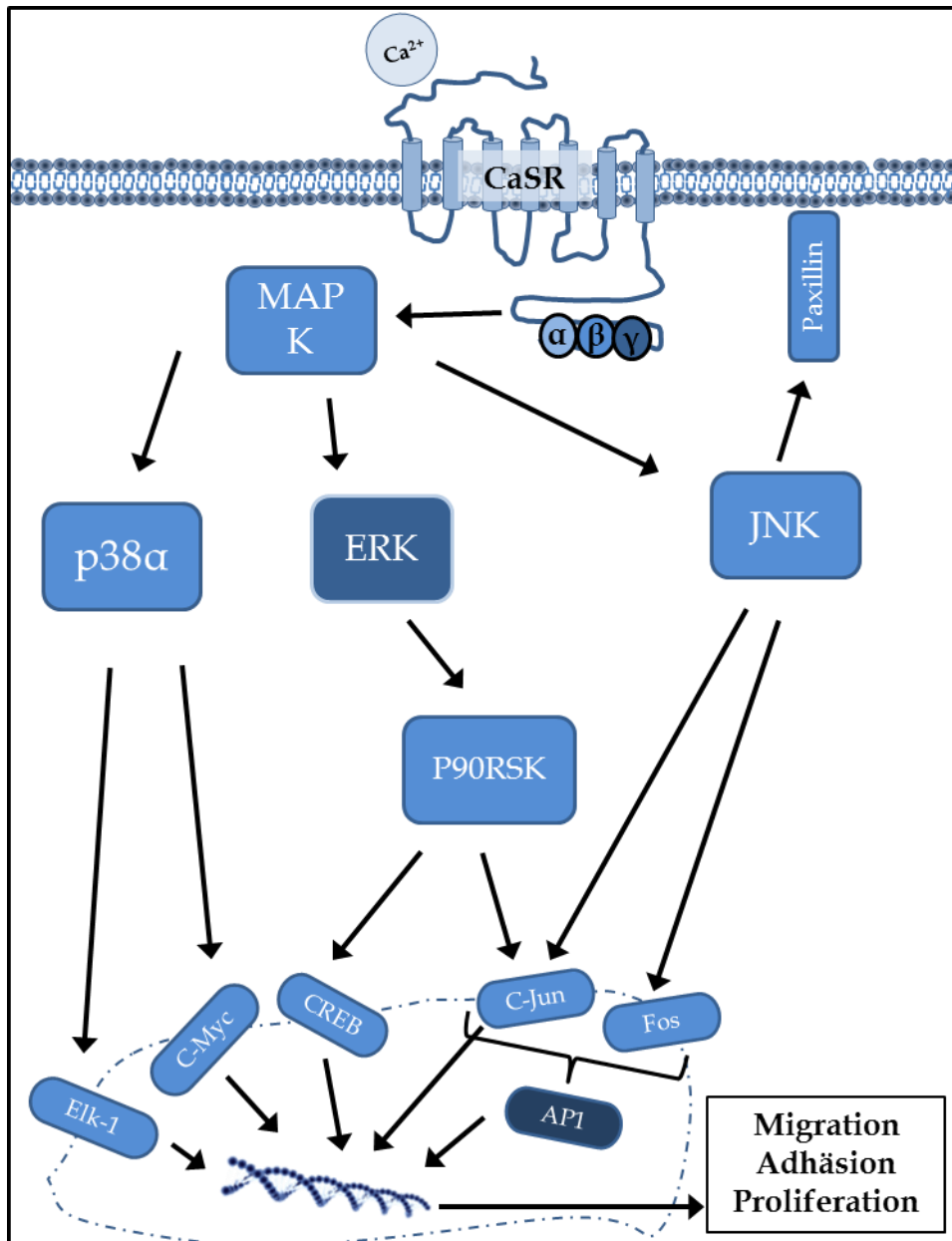


Abbildung 49: Möglicher Signalweg nach Aktivierung des CaSR durch Calcium. Nach Aktivierung des CaSR kommt es zur Phosphorylierung von einem oder mehreren Molekülen des MAP-Kinase-Signalwegs. Nach Aktivierung von ERK kommt es zur Phosphorylierung des RSK-Komplexes, der wiederum CREB und c-Jun aktiviert. JNK ist nach Aktivierung in der Lage, die Transkriptionsfaktoren c-Jun und Fos zu aktivieren, die sich zu AP-1 dimerisieren. P38α fungiert nach Aktivierung ebenfalls als Mediator der gesteigerten Proteinbiosynthese. Die Transkriptionsfaktoren wirken auf die Proteinbiosynthese der Zelle und führen zu gesteigerter Migration, Adhäsion und Proliferation.

In den CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen konnte nach Behandlung mit Calcium ebenfalls eine starke Zunahme der Proteinmenge an aktivierten ERK-Molekülen festgestellt werden (Tabelle 20). Aufgrund der schwachen Messwerte in den Kontrollzellen muss davon ausgegangen werden, dass ohne Behandlung mit

Calcium wenig oder keine Aktivität der Kinase ERK vorliegt. Kifor et al. konnten 2001 nachweisen, dass erhöhte Calcium-Level in den Nebenschilddrüsen des Rinds und auch in CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen zu einer gesteigerten Aktivität von ERK führten (Kifor et al., 2001). Die gewonnenen Daten sind leider nicht zu 100 % mit den in den funktionellen Assays gewonnenen Ergebnissen der Migration und Adhäsion erklärbar. Da beide Zellvorgänge unter anderem vom ERK-Signalweg beeinflusst werden, müsste eine starke Aktivierung des Signalwegs auch in einer Maximierung beider Potentiale resultieren. Hierbei wurde aber lediglich eine Steigerung der Migration beobachtet. Die Adhäsion der HEK-293-Zellen wurde wenig bis gar nicht beeinflusst (Abbildung 49). Allerdings kann diese Eigenschaft mit der generell schlechten Adhäsion der HEK-293-Zellen erklärt werden, die auch bereits in anderen Arbeitsgruppen beobachtet wurde und auf eine mangelnde Ausbildung des Zytoskeletts, sowie verminderter Komplexierung von Integrinen zurückzuführen ist (Papp et al., 2008).

Tabelle 20: Einfluss einer erhöhten CaSR-Expression auf intrazelluläre Signalwege (Western Blot der Zelllinie HEK-293) nach unterschiedlicher Behandlung (Ko; Ca²⁺ (10 mM - 30 Min.); NPS2143 (10 µM - 1 Std.) + Ca²⁺; Cinacalcet (10 µM - 1 Std.) + Ca²⁺). Die Werte sind in Prozent angegeben. Die einzelnen Werte wurden gemittelt und alle Daten in Relation zur Kontrolle (Transfektions-Kontrolle unbehandelt) ausgewertet (HM= Medium ohne Serum).

HEK-293 Expression/ Aktivität	Transfektions-Kontrollen				CaSR-exprimierende Klone			
	HM	Ca ²⁺	NPS 2143 +Ca ²⁺	Cina- calcet +Ca ²⁺	HM	Ca ²⁺	NPS 2143 +Ca ²⁺	Cina- calcet +Ca ²⁺
ERK	100	98	37	97	89	106	105	113
pERK (T202/Y204/ T185(Y187))	100	95	140	146	504	2919	179	2514
pSAP/ JNK (T183/Y185)	100	73	nd	84	179	781	212	720
pPaxillin (Y418)	100	104	48	108	303	730	161	465
pSHC (Y239/240)	100	52	77	83	107	505	42	330

4.1.1.6.2 Calcium führt zur Aktivierung des JNK-Signalwegs

Ein weiterer Teil des MAP-Kinase-Signalwegs neben ERK stellt die intrazelluläre Kinase JNK dar. Wie in Tabelle 18 - Tabelle 20 zu sehen, führte die Behandlung der CaSR-transfizierten Zellen mit Calcium zu einer starken Zunahme an aktivierten JNK-Molekülen. JNK wird u.a. über den Ras-Signalweg und *downstream*-verlaufende Signalmediatoren wie MKK4 phosphoryliert und aktiviert (Wagner et al., 2009). Es aktiviert seinerseits den Transkriptionsfaktor AP-1 (Sun et al., 2015). Wie bereits Ogata et al. 2006 nachweisen konnten, führte eine Behandlung von Fibroblasten mit Calcium zu einer Erhöhung der Aktivität des MAP-Kinase-Signalwegs via Phosphorylierung der einzelnen Signalweg-Komponenten, darunter JNK (Ogata et al., 2006). Drei Jahre zuvor gelang der Arbeitsgruppe um Tfelt-Hansen et al. (2003) der Nachweis, dass eine erhöhte Konzentration extrazellulärer Calcium-Ionen via MAP-Kinase-Signalweg die Phosphorylierung von JNK in Hodenkarzinomzellen begünstigt (Tfelt-Hansen et al., 2003).

JNK spielt eine weitere Rolle in der Metastasierung, indem es in der Lage ist den Tyrosinrest des Adapter-Proteins Paxillin zu phosphorylieren und somit die Migration zu begünstigen. Paxillin ist ein kleines Fokal-Adhäsion-assoziiertes Protein, welches für die Migration und Adhäsion vieler Zelltypen verantwortlich ist und normalerweise von FAK aktiviert wird. Die Phosphorylierung durch JNK führte in Hamster-Ovarien zu gesteigerter Migration (Huang et al., 2003; Huang et al., 2008). Die in den hier durchgeführten Versuchen gezeigte Steigerung der Proteinmenge aktivierter Paxillin-Moleküle betrifft allerdings nur die CaSR-HEK-293-Zellen, eben diese Zellen, bei denen der AKT-Signalweg keinen Einfluss auf die gesteigerte Migration durch Calcium hat. In diesem Fall wird die Migration nach Calcium-Behandlung durch die aktivierten Komponenten des MAP-Kinase-Signalwegs positiv beeinflusst (Abbildung 49) und fördert die bereits angesprochene Migration.

4.1.1.6.3 Calcium steigert die Aktivität des p38 α -Signalwegs

Im CaSR-transfizierten 786-O-Klon CaSR1 zeigte sich eine Zunahme der phosphorylierten p38 α -Moleküle, die das dritte Mitglied des MAP-Kinase-Signalwegs darstellen. Ausgehend von einer Aktivierung mit Hilfe des CaSR kommt es zur Phosphorylierung des Moleküls, was zur Folge hat, dass verschiedene Transkriptionsfaktoren wie Elk-1, ATF-2 und c-Myc aktiviert werden und Einfluss auf Differenzierung, Migration und Zellüberleben nehmen (Bradham et al., 2006; Grossi et al., 2014) (Abbildung 49). Eine Hemmung des p38 α -Signalwegs unterdrückt die Proliferation von Mammakarzinomzellen (Chen et al., 2009). Allerdings kann p38 α in verschiedenen Tumorentitäten unterschiedliche Rollen einnehmen. Tfelt-Hansen fand 2003 bzw. 2004 heraus, dass Calcium in Hodentumorzellen die Apoptose via CaSR und p38 α inhibiert (Tfelt-Hansen et al., 2004; Tfelt-Hansen et al., 2003). Die Arbeitsgruppe um Deacon et al. 2003 zeigten einen gegenteiligen Effekt. Hier konnte nach Calcium-Behandlung von HeLa-Zellen und nachgewiesener Aktivierung des p38 α -Signalwegs eine Apoptose-Induktion gemessen werden (Deacon et al., 2003).

In dieser Arbeit zeigte der Phospho Kinase-Array einen deutlichen Zuwachs an phosphoryliertem p38 α durch Calcium-Behandlung. Zudem zeigte sich nach Kombinationsbehandlung mit NPS2143 und Calcium eine Umkehr des durch Calcium-verursachten Effekts. Allerdings konnten diese Ergebnisse in den Western Blot-Analysen nicht verifiziert werden, sodass abschließend nicht unbedingt von einer Beteiligung des p38 α -Signalwegs an der knochenspezifischen Metastasierung der CaSR-transfizierten Zellen ausgegangen werden kann. Größeren Anteil an einer möglichen Metastasierung haben, ausgehend von den hier dargestellten Ergebnissen, die Signalmoleküle AKT, ERK und JNK.

4.1.1.7 Weitere Signalwege die durch Calcium beeinflusst werden

Neben den genannten Signalwegen konnten bei zwei weiteren Signalkaskaden Änderungen der Proteinmenge aktivierter Moleküle nach Calcium-Behandlung aufgedeckt werden. Diese beiden werden im folgenden Abschnitt vorgestellt.

4.1.1.7.1 Calcium reguliert das Adapterprotein SHC indirekt

Nach Calcium-Behandlung der CaSR-transfizierten Zellen kam es zu einer Erhöhung aktivierter SHC-Moleküle. Dies war bemerkenswert, da das Adapterprotein in der Nähe von Rezeptortyrosinkinasen (RTK), nicht von GPCR, angesiedelt ist und nach Phosphorylierung an den Tyrosinen 239/240 zur Aktivierung einer Vielzahl verschiedener Signalwege sorgt, die mit der jeweiligen RTK assoziiert sind (van der Geer et al., 1996). Die Behandlung mit Calcium könnte in diesem Fall zu einer Reduktion von PTEN geführt haben, das aus diesem Grund sein Substrat (SHC) nicht mehr dephosphorylieren und somit nicht regulieren könnte. Allerdings exprimieren die in dieser Arbeit eingesetzten 786-O-Zellen kein PTEN, sodass diese Erklärung nicht in Frage kommt. In der aktuellen Literatur lässt sich bisher kein Zusammenhang zwischen dem CaSR- und dem SHC-Signalweg finden. Allerdings ist es durchaus vorstellbar, dass *in vivo* eine CaSR-Aktivierung zur Regulation weiterer intrazellulärer Signalwege führt: Nach Migration zirkulierender Zellen in die Knochen und anschließender Proliferation würden die beim Knochenmetabolismus freigesetzten Wachstumsfaktoren wie EGF oder VEGF und Calcium-Ionen möglicherweise zu einer weiteren Stimulation der Tumorzellen führen. Primär würden die Calcium-Ionen durch die Aktivierung des CaSR und anschließender Signalweiterleitung mit Hilfe des AKT- und ERK-Signalwegs die Metastasierung fördern. Sekundär würde der gesteigerte Knochenmetabolismus durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren andere Zellen mit Hilfe von RTK und assoziiertem SHC aktivieren und rekrutieren. Durch diese Aktivierungen wäre es denkbar, dass die MAP-Kinase- oder AKT/mTOR-Signalkaskade die knochen-spezifische Metastasierung forciert, indem es die Eigenschaften der Migration, Proliferation und Adhäsion ändert.

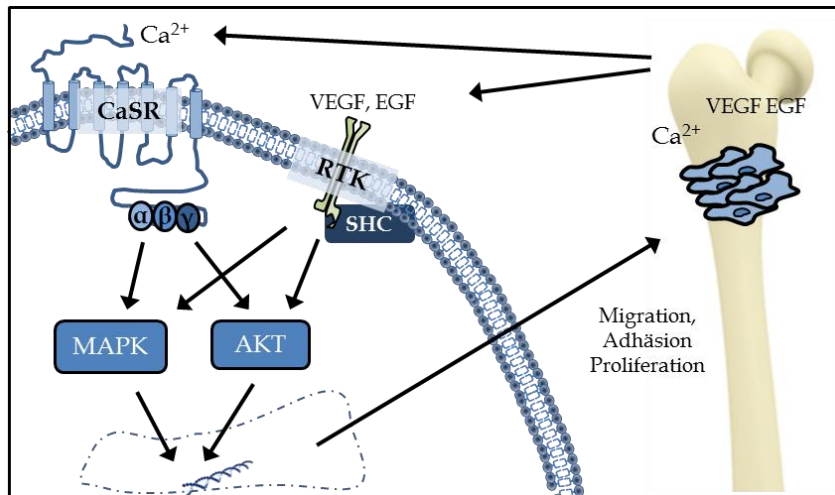


Abbildung 50: Möglicher Signalweg für SHC nach Aktivierung des CaSR via Calcium. Nach Aktivierung des CaSR kommt es zur Proliferation der Zellen und zur Ausbildung einer Metastase via AKT und ERK. Die dabei freigesetzten Wachstumsfaktoren werden von RTKs auf der Zelloberfläche erkannt und aktivieren den AKT- bzw. ERK-Signalweg erneut.

4.1.1.7.2 Calcium aktiviert Paxillin in CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen

Paxillin gehört zur Gruppe der Adapterproteine und ist in Zellen mit FAK-Molekülen assoziiert. Es bildet nach Rekrutierung von Integrinen die fokalen Adhäsionkontakte (Schaller, 2001). Durch die Ausbildung reversibler Bindungen via Integrine sind Zellen in der Lage zu migrieren oder zu adhären. Die in den CaSR-transfizierten Klonen der Zelllinie HEK-293 nach Calcium-Behandlung beobachtete gesteigerte Paxillin-Menge bedingt vermutlich die ebenfalls beobachtete gesteigerte Migration der Zellen nach Calcium-Behandlung. Durch eine Aktivierung des CaSR kam es unter anderem zu einer Aktivierung des JNK-Signalwegs, der in der Lage ist Paxillin und schließlich FAK zu phosphorylieren und somit die Migration zu regulieren (Tabelle 20) (Abbildung 51). Bei Keratinozyten des Fisches sowie Blasen Zellen der Ratte konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass JNK in der Lage ist Paxillin zu phosphorylieren und damit die Zell-Migration zu regulieren (Huang et al., 2003).

Dieser Effekt trat lediglich bei den CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen auf. Bei den transfizierten 786-O-Zellen wurde die Proteinmenge aktivierter Paxillinmoleküle nach Calcium-Behandlung nicht beeinflusst. Die Bedeutung der erwähnten Kinase FAK konnte aus methodischen Gründen nicht beurteilt werden.

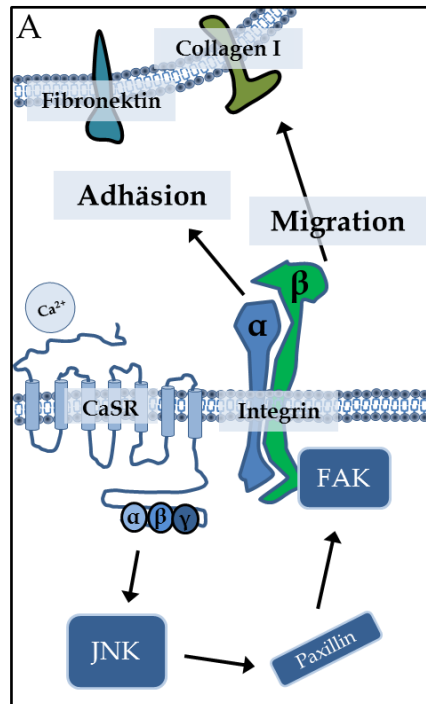


Abbildung 51: Möglicher Signalweg der Kinase Paxillin nach Calcium-Behandlung. Nach Aktivierung des CaSR durch Calcium kommt es zur Phosphorylierung von JNK. JNK ist in der Lage Paxillin zu aktivieren. Dadurch kann FAK aktiviert werden und die Zelle via Integrine fokale Adhäsionen zu anderen Zellen und/oder Strukturen eingehen.

4.1.1.7.3 Calcium reduziert die Aktivität von SRC

Eine gestörte SRC-Synthese bzw. -Aktivität ist bereits in einer Vielzahl von Tumorerkrankungen nachgewiesen worden. SRC wird in vielen gesunden Zellen exprimiert, ist dort mit Adhäsions-, Migrations- und GPC-Rezeptoren assoziiert und fördert nach Aktivierung via Phosphorylierung das Zellüberleben, sowie die Invasion und Proliferation. Bei einer Tumorerkrankung ist die SRC-Synthese bzw. die Aktivität oftmals erhöht, was zur Tumorgenese und/oder Metastasierung führen kann. Eine Blockierung von SRC führt zu verminderter Invasion und Migration im Mammakarzinom (Thakur et al., 2015). Beim Leberkarzinom führt aktiviertes SRC zu gesteigerter Invasion und fördert somit die Metastasierung (Zhao et al., 2015). Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen führten allerdings nicht zu einem Anstieg der SRC-Proteinmenge nach Calcium-Behandlung der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen, sondern zu einer Reduktion. In der Literatur ist bisher kein Fall von erhöhten pro-metastatischen Eigenschaften und gleichzeitig reduzierter SRC-Aktivität beschrieben, der hierüber eine Erklärung liefern könnte.

Eine mögliche Erklärung könnte allerdings die Aktivierung der CSK (*COOH-Terminal SRC Kinase*) liefern. CSK ist der Regulator der SRC und kann diese via Phosphorylierung deaktivieren. Hierfür muss die CSK aufgrund der fehlenden Transmembrandomäne jedoch von membranständigen Adapterproteinen wie Paxillin zur Membran rekrutiert und gebunden werden (Okada, 2012). Die Aktivierung von Paxillin wird durch die Aktivierung des MAPK-Signalwegs induziert (Rathore et al., 2007). Eine Aktivierung des CaSR mit Hilfe von Calcium würde demnach in der Hochregulation der Kinasen SRC, AKT und des MAPK-Signalwegs resultieren. Dadurch würde die Aktivierung von CSK via Paxillin zu einer Inhibition des SRC-Signalwegs führen und eine mögliche Erklärung für die Reduktion phosphorylierter SRC-Moleküle liefern (Abbildung 52). Ein Effekt auf die Proteinmenge der aktivierten SRC-Moleküle nach Calcium-Behandlung in den HEK-293-Zellen konnte nicht nachgewiesen werden.

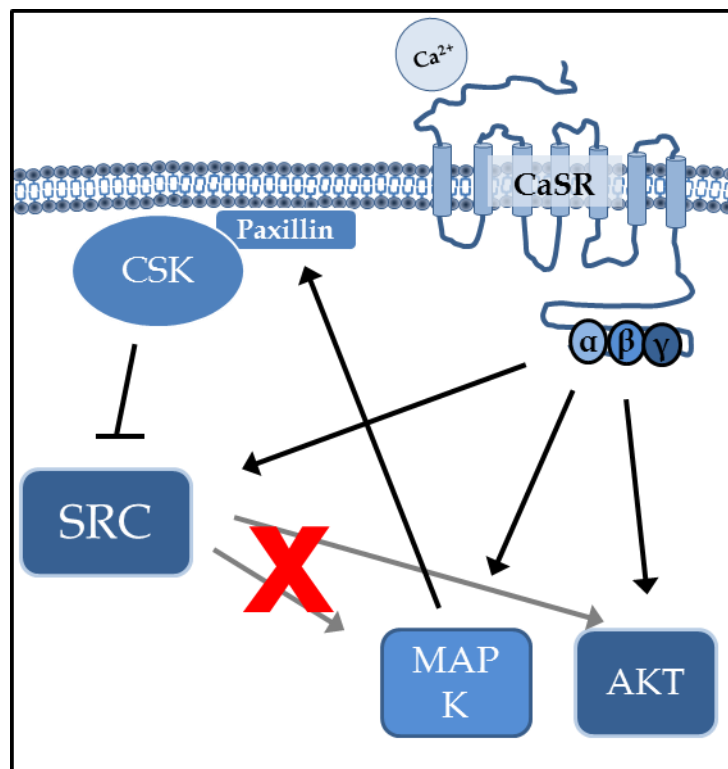


Abbildung 52: Möglicher Signalweg von SRC nach Calcium-Behandlung. Der CaSR wird durch Calcium aktiviert und phosphoryliert AKT, MAPK und SRC. SRC wird durch CSK inhibiert und führt zu keiner weiteren Aktivierung des MAPK- und AKT-Signalwegs

4.1.1.8 Die Komposition der Signalwege bei den CaSR-transfizierten 786-O-Zellen

In der Forschung kommt es vor, dass bereits bestehende Prinzipien über Bord geworfen werden, da der Fortschritt der Technik einen immer tieferen Einblick in die Materie gewährt. Dieses Phänomen besteht auch im Zusammenhang mit den verantwortlichen Signalwegen einer Tumor- oder Metastasenerkrankung/-bildung. Häufig sind bei diesen Prozessen nicht nur einzelne Signalmediatoren beteiligt. Neue Forschungsansätze postulieren, dass die Komposition, also die Abfolge und Intensität der einzelnen Parameter, in diesem Fall die Signalkaskaden, eine entscheidende Rolle spielen. Die bekanntesten, pro-tumorösen bzw. pro-metastatischen Signalwege wie AKT, ERK, JNK und p38 α können dabei nicht nur in einer Art *Auto-Feedbackloop* auf sich selbst wirken, sondern begünstigen durch Aktivierung verschiedener Proteine die Aktivierung bzw. Hochregulation eines anderen oder mehrerer Signalwege auf direktem oder indirektem Weg. Der JNK-Signalweg ist im Melanom beim Menschen auf die konstitutive Aktivierung des ERK-Signalwegs angewiesen, da dieser das Level an c-Jun-Transkriptionsfaktoren anhebt (Lopez-Bergami et al., 2007). Bei der Untersuchung von Leberkarzinomzellen in der Maus konnte ein komplexer *Crosstalk* zwischen AKT/mTOR und Ras/MAPK aufgezeigt werden, der das Fortschreiten der Erkrankung begünstigte (Wang et al., 2013). Ausgehend von diesen Untersuchungen ist auch ein ähnliches Szenario für die Metastasierung des NZK im Knochen, bzw. die hier hergestellten CaSR-transfizierten 786-O-Zellen denkbar. Durch den kontinuierlich stattfindenden Knochenmetabolismus ist es möglich, dass die potentiell knochenmetastasierenden Zellen auf Dauer nicht nur von Calcium-Ionen angeregt werden. Freigesetzte Wachstumsfaktoren, die normalerweise Osteoblasten und -klasten zum Metabolismus anregen, könnten von knochenmetastasierenden Zellen via RTK erkannt werden und intrazelluläre Signalwege der Proliferation und der Apoptoseunterdrückung wie AKT und den MAP-Kinase-Signalweg induzieren (Ara et al., 2010; Nasrazadani et al., 2011). Dabei würde die parallel ablaufende Aktivierung der Signalwege via CaSR und weiterer RTK zu einer konstitutiven Aktivierung der Zelle führen und, ähnlich wie bereits beim Mammakarzinom beschrieben, die Ausbildung eines sogenannten *Vicious Cycle*

forcieren (Waning et al., 2014). Dadurch könnte die Proliferation, also die Bildung von Makrometastasen, sowie die Etablierung weiterer Mikrometastasen durch Migration und Adhäsion von weiteren disseminierten Tumorzellen gefördert werden (Abbildung 53).

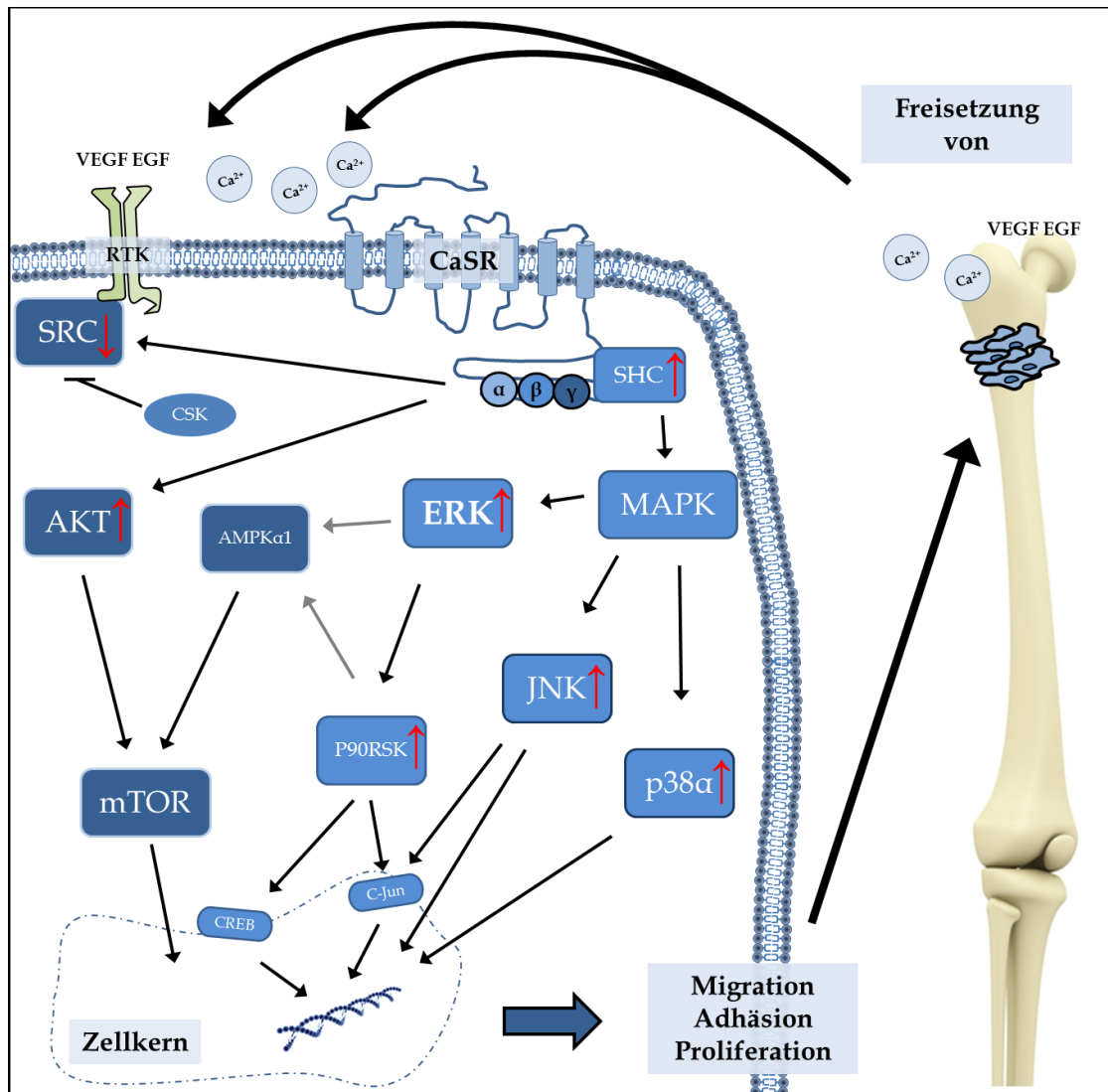


Abbildung 53: Zusammenfassung der Signalwege, die zu einem hypothetischen *Vicious Cycle* des NZK führen könnten. Rote Pfeile indizieren hoch- bzw. herunterregulierte Signalwege. Nachdem die disseminierte Tumorzellen im Knochen angekommen sind, werden sie über den CaSR via Calcium-Stimulus aktiviert. Dabei findet die Aktivierung über mehrere Signalwege, wie den MAPK- oder den AKT-Signalweg, statt. Die aberrante Proteinbiosynthese führt zu gesteigerter Migration, Adhäsion und Proliferation und intensiviert die knochenspezifische Metastasierung. Durch den Knochenmetabolismus werden neben Calcium-Ionen Wachstumsfaktoren wie VEGF oder EGF freigesetzt, die RTKs aktivieren können. Durch die Aktivierung kommt es schließlich zu einer kontinuierlichen Aktivierung der Zelle und zu einem von vorne beginnenden Teufelskreis.

4.1.1.9 Cinacalcet – ein uneffektiver Effektor

Der in dieser Arbeit eingesetzte Aktivator des CaSR ist ein Arzneistoff, der für die Behandlung des primären und sekundären Hyperparathyreoidismus zugelassen ist (Quarles, 2003). Patienten, die an der Erkrankung der Nebenschilddrüse leiden, haben einen erhöhten Spiegel an Parathormon, der ohne Behandlung zu Knochenabbau und Verkalkung der Gefäße führen kann. Schuld daran ist eine Entwicklungsstörung der Epithelkörperchen in den Nebenschilddrüsen (Baloch et al., 2013). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, handelt es sich bei Cinacalcet um einen allosterischen Modulator, der in der Lage ist den CaSR zu aktivieren. Durch seine Aktivierung kommt es bei den Patienten meist schon nach kurzer Zeit zu einer deutlichen Erniedrigung des Parathormon-Spiegels (Nemeth et al., 2013). Ausgehend von diesen Informationen wurde Cinacalcet als CaSR-Aktivator in den hier durchgeführten Experimenten eingesetzt. Ziel war es, neben der Inhibition des transfizierten CaSR mittels NPS2143 eine starke Aktivierung hervorzurufen, um die Beteiligung des CaSR in den gefundenen Ergebnissen zu den zellulären Vorgängen wie Migration, Adhäsion und Proliferation, aber auch daran beteiligter Signalwege zu beurteilen. Leider konnte in den meisten Fällen die in der Fachliteratur dargestellte Wirkweise von Cinacalcet nicht reproduziert werden. Häufig kam es bei Kombinationsbehandlung mit Calcium verglichen mit unbehandelten Zellen zwar zu einem Anstieg des zu untersuchenden Vorgangs, was aber auf die Calcium-Behandlung zurückzuführen ist. Das Maximum lag in den meisten Fällen deutlich unter dem Wert der Calcium-Behandlung, obwohl die Beteiligung des CaSR durch NPS2143 belegt war. Dies deutet auf eine Ineffektivität des eingesetzten Cinacalcet in Nierenzellen hin. Als Ursache können mehrere Gründe in Betracht gezogen werden.

Cinacalcet dient der Behandlung von Patienten mit Hyperparathyreoidismus bei chronischem Nierenversagen. Dabei wird das Medikament in sehr schwachen Dosen eingesetzt um die deutlich sensitiveren CaSR-Moleküle auf den *Chief*-Zellen der Nebenschilddrüse zu stimulieren (Canaff et al., 2002). Die dabei eingesetzten Dosen liegen bei 30 mg – 90 mg pro Tablette und Tag (Harris et al., 2004). Ausgehend von einer Durchschnittsdosis von etwa 50 mg Cinacalcet, die sich im Blut eines durch-

schnittlichen Erwachsenen (etwa 5 Liter) löst, kann folgende Rechnung erstellt werden:

$$50 \text{ mg Cinacalcet} / 5 \text{ l Blut} = 10 \text{ } \mu\text{g Cinacalcet} / 1 \text{ ml Blut}$$

Die in dieser Arbeit eingesetzte Konzentration an Cinacalcet wurde anhand von Vitalitäts-Assays bestimmt und schließlich auf 10 μM festgelegt. Anhand des Molekulargewichts von Cinacalcet lässt sich die Konzentration auf einen Milliliter umrechnen: Cinacalcet Molekulargewicht = 357,4 g/mol entspricht 3,575 μg Cinacalcet/1 ml Flüssigkeit. Die hier eingesetzte Konzentration Cinacalcet unterscheidet sich demnach nur geringfügig vom Serumlevel, welches bei Patienten während der Behandlung zu erwarten ist und kann dementsprechend nicht für die ausbleibende erweiterte Aktivierung des CaSR verantwortlich sein.

Ein weiterer Grund stellt die womöglich zu kurze Inkubationsdauer der Zellen mit Cinacalcet-Lösung dar. Die Behandlung von Hyperparathyreoidismus findet in einem Zeitraum von mehreren Wochen statt, wohingegen die Behandlung der Zellen für eine Stunde direkt vor Versuchsbeginn stattfand. Durch den kurzen Behandlungszeitraum kam es möglicherweise nicht zu einer ausreichenden Bindung der Cinacalcet-Moleküle am CaSR, sodass eine Aktivierung ausblieb. Des Weiteren wird die Wirkung von Cinacalcet *in vivo* durch eine Vielzahl von Parametern beeinflusst. Neben der Art der Ernährung (*low* bzw. *high fat*) spielt der Zeitpunkt der Einnahme eine große Rolle. Cinacalcet wird demnach besser absorbiert, wenn es mit der Nahrung oder kurz im Anschluss der Nahrungsaufnahme verabreicht wird (Purandare et al., 2014). Diese Parameter sind *in vitro* nur schwer zu reproduzieren.

Abgesehen davon ist bisher keine Literatur über Versuche an knochenmetastasierenden und CaSR-exprimierenden Zellen nach Cinacalcet-Behandlung veröffentlicht worden.

4.2 Ausblick

Ausgehend von den bereits zuvor generierten Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation die Auswirkungen einer Überexpression des CaSR auf wichtige Zellvorgänge nach Behandlung mit verschiedenen Agenzien untersucht. Die erhobenen Daten konnten an drei CaSR-exprimierenden Nierenkarzinom-Zellklonen sowie zwei CaSR-exprimierenden gesunden Nieren-Zellklonen durchgeführt werden. In weiteren Arbeiten wäre es denkbar, neben den bereits durchgeführten funktionellen Analysen den Apoptose-Status, einen wichtigen Indikator der Metastasierung, mit Hilfe von FACS-Analysen oder Caspase 9 im Western Blot zu überprüfen.

Im Zuge der hier vorliegenden Untersuchungen konnten bereits einige Signalmediatoren charakterisiert werden, die durch eine Calcium-Behandlung beeinflusst wurden und somit an einer knochenspezifischen Metastasierung beteiligt sein könnten. Interessant in Bezug auf die Migration und Adhäsion wäre sowohl die Analyse weiterer Integrine und an der Motilität beteiligter Oberflächenmoleküle sowie des Aktivitätsstatus von PLC γ (Phospholipase C γ) und der PKC. Beide sind im CaSR-Signalweg involviert und in der Literatur bereits beschrieben (Davies et al., 2007; Kifor et al., 1997).

In der aktuellen Literatur wird immer häufiger der Status verschiedener miRNAs bei Tumorerkrankungen untersucht. Die Arbeitsgruppe um Heinzelmann et al. konnte in den letzten Jahren zeigen, dass verschiedene miRNAs an der Knochenmetastasierung des NZK beteiligt sind (Eishingdrelo and Kongsamut, 2013; Heinzelmann et al., 2014). Die Untersuchung verschiedener miRNAs in den CaSR-transfizierten Zellen nach Calcium-Behandlung wäre dementsprechend ein durchaus interessanter Ansatz, um die Zellen noch genauer zu charakterisieren.

Mit Hilfe des CaSR-Antagonisten NPS2143 konnten sämtliche Calcium-induzierten Effekte der Migration, Adhäsion, Proliferation sowie daran beteiligter Signalwege aufgehoben werden. Für weitere Untersuchungen würde es sich anbieten, mit Hilfe anderer CaSR-Inhibitoren wie Calhex 231 oder NPS89636 die Ergebnisse zu wiederholen. Dies wurde auch bereits von Arbeitsgruppen an anderen Tumorentitäten mit

z.T. erfolgsversprechenden Ergebnissen durchgeführt (Tharmalingam et al., 2011). Die Verwendung des CaSR-Aktivators Cinacalcet führte zu keinem CaSR-aktivierenden Effekt, sodass es interessant wäre weitere Aktivatoren des CaSR, wie z.B. *R568-hydrochloride* oder *AC-265347* auf ihre Alternierung der Calcium-Effekte zu testen.

Vielversprechend wäre zukünftig die Umstellung der reinen Zellkultur auf ein dreidimensionales Zellkulturmodell, wie es beispielsweise die multizellulären Tumorsphäroide bieten. Der Vorteil einer Erforschung in diesem Modell liegt in der Simulation tumorähnlicher Strukturen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche basieren auf einem eindimensionalen Zellkulturmodell mit Zellen eines Typus. *In vivo* findet die Tumorerkrankung jedoch durch ein Zusammenspiel der Epithelzellen mit Fibroblasten und Endothelzellen in einer 3D-Matrix statt (Rathore et al., 2007). Hierbei wäre es nicht nur interessant zu untersuchen, ob sich zelluläre Funktionen wie die Migration, Adhäsion und Proliferation nach Calcium-Behandlung aufgrund der dreidimensionalen Anordnung ändert, sondern auch wie die daran beteiligten Signalwege beeinflusst werden.

Ein weiteres Modell zur Untersuchung des Potentials der CaSR-transfizierten Zellen, in den Knochen zu metastasieren, ist zum einen die Verwendung eines Organbades. Hierfür werden die zu untersuchenden Organe (in diesem Fall der Oberschenkelknochen einer Maus) aus dem Versuchstier extrahiert und in einem als Organbad bezeichneten Gefäß mit Nährstoffen versorgt. Die Zellen würden direkt in den Knochen gespritzt und nach neun Wochen auf ausgeprägte Makrometastasen untersucht. Zum anderen wäre es möglich die Zellen mit einem fluoreszierenden Reporter gen zu transfizieren, um sie anschließend in ein embryonales Huhn-Modell zu injizieren. Die Auswertung nach mehreren Tagen würde zeigen, ob und in welche Organe des sich entwickelnden Huhns die doppelt-transfizierten Zellen gewandert sind.

Der ultimative Beweis über die Fähigkeiten der CaSR-transfizierten Zellen in den Knochen zu metastasieren besteht allerdings in der Injektion der Zellen in Versuchsmäuse und anschließender Analyse der klassischen Metastasierungsorgane

des NZK. Denkbar wäre auch in diesem Fall eine zuvor durchgeführte Zweit-Transfektion der CaSR-transfizierten Zellen mit Hilfe eines fluoreszierenden Reportergens zur besseren Visualisierung der Ergebnisse. Durch *live imaging* könnte die Verteilung der fluoreszierenden Zellen im Versuchstier detektiert werden. Weiterhin würde der Einsatz von NPS2143 im Tiermodell nicht nur die Relevanz des CaSR für die Knochenmetastasierung beurteilen, sondern möglicherweise einen neuen therapeutischen Ansatz zur Prävention von Knochenmetastasen für Patienten darstellen, die im Primärtumor den CaSR vermehrt exprimieren.

Nach Durchführung der hier vorgeschlagenen Versuche, ist es zukünftig denkbar den CaSR als präventiven Therapieansatz für die Früherkennung von Knochenmetastasen einzusetzen und dementsprechend gezielt und personalisiert gegen die Erkrankung vorzugehen.

5 Zusammenfassung

Der Grund für die schlechte Prognose beim Nierenzellkarzinom (NZK) stellt nicht der Primärtumor dar sondern ist vielmehr der häufigen Ausbildung von Fernmetastasen geschuldet. Etwa 30 % aller Patienten mit fortgeschrittenem NZK bilden dabei Metastasen in den Knochen aus. Das Knochenmilieu scheint, aufgrund der hohen Frequenz der knochenspezifischen Metastasierung, einen idealen Wachstumslokalität für die Nierenkarzinomzellen darzustellen und rückte in der jüngsten Vergangenheit in den Fokus der Forschung. Dabei konnte der Calcium-sensitive Rezeptor (CaSR), der im gesunden Gewebe die Konzentration der extrazellulären Calcium-Ionen reguliert und besonders in der Niere von Bedeutung ist, mit der Metastasierung in die Knochen in Zusammenhang gebracht werden. Die Knochen stellen im Körper das Organ mit der höchsten Calcium-Konzentration dar. Durch ständigen Knochenmetabolismus werden Calcium-Ionen freigesetzt, welche CaSR-exprimierende Zellen aktivieren können. Aus diesem Grund wurden im Zusammenhang mit dieser Arbeit Nierenkarzinomzellen (786-O) sowie gesunde Nierenzellen (HEK-293) mit dem Gen des CaSR transfiziert und anschließend unter dem Einfluss von Calcium (10 mM - 30 Min.), einem CaSR-Aktivator (Cinacalcet (10 µM - 1 Std.)), sowie einem CaSR-Inhibitor (NPS2143 (10 µM - 1 Std.)) auf Unterschiede im zellulären Verhalten hin untersucht.

Bereits ohne Calcium-Behandlung zeigten die CaSR-transfizierten 786-O-Zellen ein gesteigertes Migrationsverhalten (durchgeführt in einer Boyden Kammer, Fibronectin als Chemotaxin) und ein erhöhtes Adhäsionspotential (zum einen an Komponenten der EZM (Fibronectin und Kollagen I) und zum anderen an HUVEC). Bei den CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen wurde nur die Migration positiv beeinflusst. Nach einer 30-minütigen Behandlung mit Calcium zeigten die CaSR-transfizierten 786-O-Zellen eine starke Zunahme des Adhäsions- und Proliferationsverhaltens, sowie eine verstärkte Migration bei Verwendung von Calcium als Chemotaxin. CaSR-transfizierte HEK-293-Zellen hingegen zeigten keine Migration und nach Calcium-Behandlung nur geringfügige Änderungen in Adhäsion und Proliferation. Konsistent mit diesen Ergebnissen war die Auswertung der

intrazellulären Signalwege mit Hilfe von Western Blot-Analysen. In CaSR-exprimierenden 786-O-Zellen waren die Signalwege AKT, ERK, JNK und p38 α nach Calcium-Behandlung deutlich erhöht. In den HEK-293-Zellen kam es zu einer Zunahme der Proteinmenge aktivierter ERK-, JNK-, Paxillin- und SHC-Moleküle. Mit Hilfe einer Kombinationsbehandlung aus NPS2143 und Calcium konnte der Calcium-bedingte Effekt in durchweg allen Untersuchungen wieder bis auf das Kontrollniveau gesenkt werden. Die Verwendung von Cinacalcet und Calcium führte zwar erneut zu deutlichen Steigerungen der zellulären Vorgänge, lag aber immer unter dem Calcium-abhängigen Maximum.

Durch die Simulation der Vorgänge, die während einer Metastasierung ablaufen, konnte gezeigt werden, dass der CaSR in Nierenkarzinomzellen die Knochenmetastasierung induziert. Sollten sich diese Zusammenhänge *in vivo* im Mausmodell bestätigen, könnte der CaSR zukünftig als Marker für eine Früherkennung von Knochenmetastasen fungieren. Zudem könnten individualisierte Therapieansätze entwickelt werden, die knochenmetastasierende Zellen bereits vor Metastasierung effizient bekämpfen können.

6 Summary

The poor prognosis of renal cell carcinoma (RCC) is linked to the existence of metastases during primary check-up of the patients. About 30 % of patients with RCC develop bone metastases during disease. The bone milieu seems to play a crucial role in tumor growth due to the high frequency of bone-specific metastasis of RCC. Since increased scientific focus on involved mechanisms, the calcium-sensing receptor (CaSR), a regulator of extracellular calcium-concentration and a key protein in kidney calcium-homeostasis, was associated with bone-specific metastasis.

The highest calcium-concentration throughout the body is found in bones. During bone metabolism, calcium ions are released and able to activate CaSR expressing cells. Relating to this work renal carcinoma cells (786-O) and healthy kidney cells (HEK-293) were stably transfected with the gene for CaSR. The differences in functional behavior was tested afterwards under influence of calcium (10 mM - 30 min.) or a combination of a CaSR activator (Cinacalcet (10 μ M - 1 hr.)) + calcium or a combination of a CaSR inhibitor (NPS2143 (10 μ M - 1 hr.)) + calcium, respectively.

CaSR transfected renal carcinoma cells showed a higher migratory (measured in a Boyden chamber, fibronectin as chemotaxin) and adhesory potential (carried out on components of the extracellular matrix (ECM) (fibronectin and collagen I) or on endothelial cells) even without calcium-influence. Transfected HEK-293-cells showed an increase in migration (fibronectin) but not in adhesion. A 30 minute incubation with calcium lead to a strong increase in adhesion and proliferation of the CaSR transfected 786-O cells. The migration using calcium as a chemotaxin resulted in a stronger migratory potential compared to control cells. CaSR-transfected HEK-293 cells showed no migratory behavior after calcium treatment and only slight enhancements in adhesion potential. Consistent with these results were the findings concerning the intracellular pathways in western blot analyses. The signal pathways of AKT, ERK, JNK and p38 α were strongly elevated in 786-O cells expressing the CaSR after calcium treatment. In HEK-293 cells elevated levels of ERK, JNK, SHC and Paxillin were found. The treatment of NPS2143 + calcium led to an inversion of

the calcium-triggered effects in nearly all experiments and cells. Treatment of Cinacalcet with calcium again led to an increase in cellular processes but clearly under the calcium-triggered maximum at nearly all times.

The CaSR-transfected 786-O cells seem to be able to develop metastases into bones, as in this work the simulation of the typical steps of metastasis revealed. Further investigations, e.g. infusion of the CaSR expressing renal carcinoma cells in a mouse model, need to be done that may lead to a broader understanding of the CaSR and its ability to serve as a biomarker to predict bone metastasis. It is possible to imagine that future therapies regarding the CaSR as a key player in bone-specific metastasis may lead to a superior outcome in treatment of patients affected with the disease.

7 Literaturverzeichnis

- Aggarwal A., Tennakoon S., Wohlgenannt M., Boudot C., Mentaverri R. and 2014. The tumor suppressor, calcium sensing receptor, regulates proliferation and promotes differentiation in colon cancer AACR Annual Meeting, San Diego.
- Alberts B., Johnson A., Walter P. and Lewis J. 2007. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 5th Revised Edition. Taylor & Francis Ltd.
- Albiges L., Molinie V. and Escudier B. (2012). *Non-clear cell renal cell carcinoma: does the mammalian target of rapamycin represent a rational therapeutic target?* *The oncologist* 17:1051-1062.
- Alizadeh A. M., Shiri S. and Farsinejad S. (2014). *Metastasis review: from bench to bedside. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35:8483-8523.
- Almog N. (2010). *Molecular mechanisms underlying tumor dormancy.* *Cancer letters* 294:139-146.
- Ara T. and Declerck Y. A. (2010). *Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression.* *European journal of cancer* 46:1223-1231.
- Ba J. and Friedman P. A. (2004). *Calcium-sensing receptor regulation of renal mineral ion transport.* *Cell calcium* 35:229-237.
- Bai L., Yang J. C., Ok J. H., Mack P. C., Kung H. J. and Evans C. P. (2012). *Simultaneous targeting of Src kinase and receptor tyrosine kinase results in synergistic inhibition of renal cell carcinoma proliferation and migration.* *International journal of cancer. Journal international du cancer* 130:2693-2702.
- Bai M., Trivedi S., Lane C. R., Yang Y., Quinn S. J. and Brown E. M. (1998). *Protein kinase C phosphorylation of threonine at position 888 in Ca²⁺-sensing receptor (CaR) inhibits coupling to Ca²⁺ store release.* *The Journal of biological chemistry* 273:21267-21275.
- Baloch Z. W. and LiVolsi V. A. (2013). *Pathology of the parathyroid glands in hyperparathyroidism.* *Seminars in diagnostic pathology* 30:165-177.
- Banumathy G. and Cairns P. (2010). *Signaling pathways in renal cell carcinoma.* *Cancer biology & therapy* 10:658-664.
- Banyra O., Tarchynets M. and Shulyak A. (2014). *Renal cell carcinoma: how to hit the targets?* *Central European journal of urology* 66:394-404.
- Barczyk M., Carracedo S. and Gullberg D. (2010). *Integrins.* *Cell and tissue research* 339:269-280.
- Bedke J. and Stenzl A. (2010). *[Renal cell carcinoma: recent developments in diagnostics and therapy].* *Der Urologe. Aug. A* 49 Suppl 1:178-184.
- Berger C. E., Rathod H., Gillespie J. I., Horrocks B. R. and Datta H. K. (2001). *Scanning Electrochemical Microscopy at the Surface of Bone-Resorbing Osteoclasts: Evidence for Steady-State Disposal and Intracellular Functional Compartmentalization of Calcium.* *Journal of Bone and Mineral research* 16:2092-2102.
- Birchmeier C., Birchmeier W., Gherardi E. and Vande Woude G. F. (2003). *Met, metastasis, motility and more.* *Nature reviews. Molecular cell biology* 4:915-925.
- Birnboim H. C. and Doly J. (1979). *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.* *Nucleic acids research* 7:1513-1523.

- Blood C. H. and Zetter B. R. (1990). *Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis*. *Biochimica et biophysica acta* 1032:89-118.
- Boot-Handford R. P. and Tuckwell D. S. (2003). *Fibrillar collagen: the key to vertebrate evolution? A tale of molecular incest*. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 25:142-151.
- Bosel J., John M., Freichel M. and Blind E. (2003). *Signaling of the human calcium-sensing receptor expressed in HEK293-cells is modulated by protein kinases A and C*. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 111:21-26.
- Bradham C. and McClay D. R. (2006). *p38 MAPK in development and cancer*. *Cell cycle* 5:824-828.
- Brauner-Osborne H., Wellendorph P. and Jensen A. A. (2007). *Structure, pharmacology and therapeutic prospects of family C G-protein coupled receptors*. *Current drug targets* 8:169-184.
- Brown E. M. (2000). *The extracellular Ca²⁺-sensing receptor: central mediator of systemic calcium homeostasis*. *Annual review of nutrition* 20:507-533.
- Brown E. M., Gamba G., Riccardi D., Lombardi M., Butters R., Kifor O., Sun A., Hediger M. A., Lytton J. and Hebert S. C. (1993). *Cloning and characterization of an extracellular Ca²⁺-sensing receptor from bovine parathyroid*. *Nature* 366:575-580.
- Brown E. M. and MacLeod R. J. (2001). *Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling*. *Physiological reviews* 81:239-297.
- Bu L., Michino M., Wolf R. M. and Brooks C. L., 3rd. (2008). *Improved model building and assessment of the Calcium-sensing receptor transmembrane domain*. *Proteins* 71:215-226.
- Buentig N., Storkel S. and Atzpodien J. (2002). *[Molecular genetic changes in renal cell carcinomas]*. *Der Urologe. Ausg. A* 41:475-481.
- Bustamante M., Hasler U., Leroy V., de Seigneux S., Dimitrov M., Mordasini D., Rousselot M., Martin P. Y. and Feraille E. (2008). *Calcium-sensing receptor attenuates AVP-induced aquaporin-2 expression via a calmodulin-dependent mechanism*. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 19:109-116.
- Byun S. S., Yeo W. G., Lee S. E. and Lee E. (2007). *Expression of survivin in renal cell carcinomas: association with pathologic features and clinical outcome*. *Urology* 69:34-37.
- Cairns P. (2010). *Renal cell carcinoma*. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers* 9:461-473.
- Canaff L. and Hendy G. N. (2002). *Human calcium-sensing receptor gene. Vitamin D response elements in promoters P1 and P2 confer transcriptional responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D*. *The Journal of biological chemistry* 277:30337-30350.
- Casala C., Gil-Guinon E., Ordonez J. L., Miguel-Queralt S., Rodriguez E., Galvan P., Lavarino C., Munell F., de Alava E., Mora J. and de Torres C. (2013). *The calcium-sensing receptor is silenced by genetic and epigenetic mechanisms in unfavorable neuroblastomas and its reactivation induces ERK1/2-dependent apoptosis*. *Carcinogenesis* 34:268-276.
- Cavanaugh A., Huang Y. and Breitwieser G. E. (2012). *Behind the curtain: cellular mechanisms for allosteric modulation of calcium-sensing receptors*. *British journal of pharmacology* 165:1670-1677.

- Chakravarti B., Dwivedi S. K., Mithal A. and Chattopadhyay N. (2009). *Calcium-sensing receptor in cancer: good cop or bad cop?* Endocrine 35:271-284.
- Chen L., Mayer J. A., Krisko T. I., Speers C. W., Wang T., Hilsenbeck S. G. and Brown P. H. (2009). *Inhibition of the p38 kinase suppresses the proliferation of human ER-negative breast cancer cells.* Cancer research 69:8853-8861.
- Chen R. A. and Goodman W. G. (2004). *Role of the calcium-sensing receptor in parathyroid gland physiology.* American journal of physiology. Renal physiology 286:F1005-1011.
- Chou A., Toon C., Pickett J. and Gill A. J. (2013). *von Hippel-Lindau syndrome.* Frontiers of hormone research 41:30-49.
- Clark P. E. (2009). *The role of VHL in clear-cell renal cell carcinoma and its relation to targeted therapy.* Kidney international 76:939-945.
- Clarke B. (2008). *Normal bone anatomy and physiology.* Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN 3 Suppl 3:S131-139.
- Cohen H. T. and McGovern F. J. (2005). *Renal-cell carcinoma.* The New England journal of medicine 353:2477-2490.
- Crumley S. M., Divatia M., Truong L., Shen S., Ayala A. G. and Ro J. Y. (2013). *Renal cell carcinoma: Evolving and emerging subtypes.* World journal of clinical cases 1:262-275.
- Cully M., You H., Levine A. J. and Mak T. W. (2006). *Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis.* Nature reviews. Cancer 6:184-192.
- Davies S. L., Ozawa A., McCormick W. D., Dvorak M. M. and Ward D. T. (2007). *Protein kinase C-mediated phosphorylation of the calcium-sensing receptor is stimulated by receptor activation and attenuated by calyculin-sensitive phosphatase activity.* The Journal of biological chemistry 282:15048-15056.
- Deacon K., Mistry P., Chernoff J., Blank J. L. and Patel R. (2003). *p38 Mitogen-activated protein kinase mediates cell death and p21-activated kinase mediates cell survival during chemotherapeutic drug-induced mitotic arrest.* Molecular biology of the cell 14:2071-2087.
- Doehn U., Hauge C., Frank S. R., Jensen C. J., Duda K., Nielsen J. V., Cohen M. S., Johansen J. V., Winther B. R., Lund L. R., Winther O., Taunton J., Hansen S. H. and Frodin M. (2009). *RSK is a principal effector of the RAS-ERK pathway for eliciting a coordinate promotile/invasive gene program and phenotype in epithelial cells.* Molecular cell 35:511-522.
- Dutta A., Li J., Lu H., Akech J., Pratap J., Wang T., Zerlanko B. J., FitzGerald T. J., Jiang Z., Birbe R., Wixted J., Violette S. M., Stein J. L., Stein G. S., Lian J. B. and Languino L. R. (2014). *Integrin α v β 6 promotes an osteolytic program in cancer cells by upregulating MMP2.* Cancer research 74:1598-1608.
- Eishingdrelo H. and Kongsamut S. (2013). *Minireview: Targeting GPCR Activated ERK Pathways for Drug Discovery.* Current chemical genomics and translational medicine 7:9-15.
- El Hiani Y., Ahidouch A., Lehen'kyi V., Hague F., Gouilleux F., Mentaverri R., Kamel S., Lassoued K., Brule G. and Ouadid-Ahidouch H. (2009). *Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 and TRPC1 channels are required for calcium-sensing receptor-stimulated MCF-7 breast cancer cell proliferation.* Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology 23:335-346.

- Faivre S., Delbaldo C., Vera K., Robert C., Lozahic S., Lassau N., Bello C., Deprimo S., Brega N., Massimini G., Armand J. P., Scigalla P. and Raymond E. (2006). *Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 24:25-35.
- Fan G., Goldsmith P. K., Collins R., Dunn C. K., Krapcho K. J., Rogers K. V. and Spiegel A. M. (1997). *N-linked glycosylation of the human Ca²⁺ receptor is essential for its expression at the cell surface*. Endocrinology 138:1916-1922.
- Fidler I. J., Yano S., Zhang R. D., Fujimaki T. and Bucana C. D. (2002). *The seed and soil hypothesis: vascularisation and brain metastases*. The lancet oncology 3:53-57.
- Flanigan R. C., Campbell S. C., Clark J. I. and Picken M. M. (2003). *Metastatic renal cell carcinoma*. Current treatment options in oncology 4:385-390.
- Flanigan R. C., Mickisch G., Sylvester R., Tangen C., Van Poppel H. and Crawford E. D. (2004). *Cytoreductive nephrectomy in patients with metastatic renal cancer: a combined analysis*. The Journal of urology 171:1071-1076.
- Fornara P. and Hoda M. R. (2011). [Renal cell carcinoma]. Der Urologe. Aug. A 50 Suppl 1:219-222.
- Fourneau I. and Broos P. (1998). *Pathologic fractures due to metastatic disease. A retrospective study of 160 surgically treated fractures*. Acta chirurgica Belgica 98:255-260.
- Friedl P. and Alexander S. (2011). *Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity*. Cell 147:992-1009.
- Fuhrman S. A., Lasky L. C. and Limas C. (1982). *Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma*. The American journal of surgical pathology 6:655-663.
- Gakhar G., Navarro V. N., Jurish M., Lee G. Y., Tagawa S. T., Akhtar N. H., Seandel M., Geng Y., Liu H., Bander N. H., Giannakakou P., Christos P. J., King M. R. and Nanus D. M. (2013). *Circulating tumor cells from prostate cancer patients interact with E-selectin under physiologic blood flow*. PloS one 8:e85143.
- Geng Y., Marshall J. R. and King M. R. (2012). *Glycomechanics of the metastatic cascade: tumor cell-endothelial cell interactions in the circulation*. Annals of biomedical engineering 40:790-805.
- Gherardi E., Birchmeier W., Birchmeier C. and Vande Woude G. (2012). *Targeting MET in cancer: rationale and progress*. Nature reviews. Cancer 12:89-103.
- Goldsmith P. K., Fan G., Miller J. L., Rogers K. V. and Spiegel A. M. (1997). *Monoclonal antibodies against synthetic peptides corresponding to the extracellular domain of the human Ca²⁺ receptor: characterization and use in studying concanavalin A inhibition*. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research 12:1780-1788.
- Grossi V., Peserico A., Tezil T. and Simone C. (2014). *p38alpha MAPK pathway: a key factor in colorectal cancer therapy and chemoresistance*. World journal of gastroenterology : WJG 20:9744-9758.
- Gunnarsson O., Pfanzer N. R., Cohen R. B. and Keefe S. M. (2015). *Evaluating the safety and efficacy of axitinib in the treatment of advanced renal cell carcinoma*. Cancer management and research 7:65-73.

- Haas N. B. and Nathanson K. L. (2014). *Hereditary kidney cancer syndromes*. *Advances in chronic kidney disease* 21:81-90.
- Haferkamp A., Rohde D., Muller S. C., Rubben H. and Hohenfellner M. (2006). *[Renal cell carcinoma]*. *Der Urologe. Ausg. A* 45 Suppl 4:74-84.
- Hanahan D. (1985). *Techniques for transformation in Escherichia coli*. *DNA Cloning* 1:109-135.
- Harris R. Z., Padhi D., Marbury T. C., Noveck R. J., Salfi M. and Sullivan J. T. (2004). *Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of cinacalcet hydrochloride in hemodialysis patients at doses up to 200 mg once daily*. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 44:1070-1076.
- Hazan R. B., Qiao R., Keren R., Badano I. and Suyama K. (2004). *Cadherin switch in tumor progression*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1014:155-163.
- Heinzelmann J., Unrein A., Wickmann U., Baumgart S., Stapf M., Szendroi A., Grimm M. O., Gajda M. R., Wunderlich H. and Junker K. (2014). *MicroRNAs with prognostic potential for metastasis in clear cell renal cell carcinoma: a comparison of primary tumors and distant metastases*. *Annals of surgical oncology* 21:1046-1054.
- Hendy G. N., Canaff L. and Cole D. E. (2013). *The CASR gene: alternative splicing and transcriptional control, and calcium-sensing receptor (CaSR) protein: structure and ligand binding sites*. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 27:285-301.
- Hernandez-Bedolla M. A., Carretero-Ortega J., Valadez-Sanchez M., Vazquez-Prado J. and Reyes-Cruz G. (2015). *Chemotactic and proangiogenic role of calcium sensing receptor is linked to secretion of multiple cytokines and growth factors in breast cancer MDA-MB-231 cells*. *Biochimica et biophysica acta* 1853:166-182.
- Hers I., Vincent E. E. and Tavaré J. M. (2011). *Akt signalling in health and disease*. *Cellular signalling* 23:1515-1527.
- Hills C. E., Younis M. Y., Bennett J., Siamantouras E., Liu K. K. and Squires P. E. (2012). *Calcium-sensing receptor activation increases cell-cell adhesion and beta-cell function*. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 30:575-586.
- Hjalm G., MacLeod R. J., Kifor O., Chattopadhyay N. and Brown E. M. (2001). *Filamin-A binds to the carboxyl-terminal tail of the calcium-sensing receptor, an interaction that participates in CaR-mediated activation of mitogen-activated protein kinase*. *The Journal of biological chemistry* 276:34880-34887.
- Holland W. S., Tepper C. G., Pietri J. E., Chinn D. C., Gandara D. R., Mack P. C. and Lara P. N., Jr. (2012). *Evaluating rational non-cross-resistant combination therapy in advanced clear cell renal cell carcinoma: combined mTOR and AKT inhibitor therapy*. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 69:185-194.
- Hood J. D. and Cheresch D. A. (2002). *Role of integrins in cell invasion and migration*. *Nature reviews. Cancer* 2:91-100.
- Houillier P., Nicolet-Barousse L., Maruani G. and Paillard M. (2003). *What keeps serum calcium levels stable? Joint, bone, spine* : revue du rhumatisme 70:407-413.
- Hu J. and Spiegel A. M. (2007). *Structure and function of the human calcium-sensing receptor: insights from natural and engineered mutations and allosteric modulators*. *Journal of cellular and molecular medicine* 11:908-922.

- Huang C., Rajfur Z., Borchers C., Schaller M. D. and Jacobson K. (2003). *JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration*. Nature 424:219-223.
- Huang Z., Yan D. P. and Ge B. X. (2008). *JNK regulates cell migration through promotion of tyrosine phosphorylation of paxillin*. Cellular signalling 20:2002-2012.
- Humphries M. J. (2000). *Integrin structure*. Biochemical Society transactions 28:311-339.
- Irmisch A. and Huelsken J. (2013). *Metastasis: New insights into organ-specific extravasation and metastatic niches*. Experimental cell research 319:1604-1610.
- Jean D. and Bar-Eli M. (2000). *Regulation of tumor growth and metastasis of human melanoma by the CREB transcription factor family*. Molecular and cellular biochemistry 212:19-28.
- Jemal A., Bray F., Center M. M., Ferlay J., Ward E. and Forman D. (2011). *Global cancer statistics*. CA: a cancer journal for clinicians 61:69-90.
- Jensen A. A. and Brauner-Osborne H. (2007). *Allosteric modulation of the calcium-sensing receptor*. Current neuropharmacology 5:180-186.
- Jeon J. S., Zervantonakis I. K., Chung S., Kamm R. D. and Charest J. L. (2013). *In vitro model of tumor cell extravasation*. PloS one 8:e56910.
- Jöckel E., Haber T., Prawitt D., Junker K., Hampel C., Thuroff J. W., Roos F. C. and Brenner W. (2014). *High calcium concentration in bones promotes bone metastasis in renal cell carcinomas expressing calcium-sensing receptor*. Molecular cancer 13:42.
- Jonasch E., Gao J. and Rathmell W. K. (2014). *Renal cell carcinoma*. Bmj 349:g4797.
- Kallay E. (2013). "The role of the calcium sensing receptor (CaSR) in health and disease, implications for translational medicine" or the multifaceted CaSR: a Training Network for young scientists. Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism 27:279-281.
- Keisner S. V. and Shah S. R. (2011). *Pazopanib: the newest tyrosine kinase inhibitor for the treatment of advanced or metastatic renal cell carcinoma*. Drugs 71:443-454.
- Khan N. and Mukhtar H. (2010). *Cancer and metastasis: prevention and treatment by green tea*. Cancer metastasis reviews 29:435-445.
- Kifor O., Diaz R., Butters R. and Brown E. M. (1997). *The Ca²⁺-sensing receptor (CaR) activates phospholipases C, A2, and D in bovine parathyroid and CaR-transfected, human embryonic kidney (HEK293) cells*. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research 12:715-725.
- Kifor O., MacLeod R. J., Diaz R., Bai M., Yamaguchi T., Yao T., Kifor I. and Brown E. M. (2001). *Regulation of MAP kinase by calcium-sensing receptor in bovine parathyroid and CaR-transfected HEK293 cells*. American journal of physiology. Renal physiology 280:F291-302.
- Kingsley L. A., Fournier P. G., Chirgwin J. M. and Guise T. A. (2007). *Molecular biology of bone metastasis*. Molecular cancer therapeutics 6:2609-2617.
- Kinsey D. L. (1960). *An experimental study of preferential metastasis*. Cancer 13:674-676.
- Kitazawa S. and Kitazawa R. (2002). *RANK ligand is a prerequisite for cancer-associated osteolytic lesions*. The Journal of pathology 198:228-236.
- Kondo H., Guo J. and Bringhurst F. R. (2002). *Cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A mediates parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor regulation of osteoclastogenesis and expression of RANKL and osteoprotegerin mRNAs by marrow stromal*

- cells. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 17:1667-1679.
- Kozlow W. and Guise T. A. (2005). *Breast cancer metastasis to bone: mechanisms of osteolysis and implications for therapy*. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 10:169-180.
- Krauss G. 2003. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, vol. Third Edition, Completely Revised. Wiley.
- Krebsregisterdaten Z. f. 2011. Krebs in Deutschland.
- Kuczyk M., Kruck S. and Merseburger A. S. (2007). [Efficacy of multikinase inhibitors in the treatment of advanced renal cell cancer. A snapshot]. *Der Urologe. Ausg. A* 46:504-508, 510.
- Langley R. R. and Fidler I. J. (2011). *The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs*. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 128:2527-2535.
- Lechertier T. and Hodivala-Dilke K. (2012). *Focal adhesion kinase and tumour angiogenesis*. *The Journal of pathology* 226:404-412.
- Li G. W., Xing W. J., Bai S. Z., Hao J. H., Guo J., Li H. Z., Li H. X., Zhang W. H., Yang B. F., Wu L. Y., Wang R., Yang G. D. and Xu C. Q. (2011). *The calcium-sensing receptor mediates hypoxia-induced proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells through MEK1/ERK1,2 and PI3K pathways*. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 108:185-193.
- Li H. X., Kong F. J., Bai S. Z., He W., Xing W. J., Xi Y. H., Li G. W., Guo J., Li H. Z., Wu L. Y., Wang R., Yang G. D., Tian Y. and Xu C. Q. (2012). *Involvement of calcium-sensing receptor in oxLDL-induced MMP-2 production in vascular smooth muscle cells via PI3K/Akt pathway*. *Molecular and cellular biochemistry* 362:115-122.
- Li T., Sun M., Yin X., Wu C., Wu Q., Feng S., Li H., Luan Y., Wen J., Yan L., Zhao B., Xu C. and Sun Y. (2013). *Expression of the calcium sensing receptor in human peripheral blood T lymphocyte and its contribution to cytokine secretion through MAPKs or NF-kappaB pathways*. *Molecular immunology* 53:414-420.
- Liao J., Schneider A., Datta N. S. and McCauley L. K. (2006). *Extracellular calcium as a candidate mediator of prostate cancer skeletal metastasis*. *Cancer research* 66:9065-9073.
- Liou A. P., Sei Y., Zhao X., Feng J., Lu X., Thomas C., Pechhold S., Raybould H. E. and Wank S. A. (2011). *The extracellular calcium-sensing receptor is required for cholecystokinin secretion in response to L-phenylalanine in acutely isolated intestinal I cells*. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 300:G538-546.
- Lisztwan J., Imbert G., Wirbelauer C., Gstaiger M. and Krek W. (1999). *The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity*. *Genes & development* 13:1822-1833.
- Ljungberg B., Campbell S. C., Choi H. Y., Jacqmin D., Lee J. E., Weikert S. and Kiemeny L. A. (2011). *The epidemiology of renal cell carcinoma*. *European urology* 60:615-621.
- Lopez-Bergami P., Huang C., Goydos J. S., Yip D., Bar-Eli M., Herlyn M., Smalley K. S., Mahale A., Eroshkin A., Aaronson S. and Ronai Z. (2007). *Rewired ERK-JNK signaling pathways in melanoma*. *Cancer cell* 11:447-460.
- Lu X. and Kang Y. (2007). *Organotropism of breast cancer metastasis*. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 12:153-162.

- Lumachi F., Brunello A., Roma A. and Basso U. (2009). *Cancer-induced hypercalcemia*. *Anticancer research* 29:1551-1555.
- Magno A. L., Ward B. K. and Ratajczak T. (2011). *The calcium-sensing receptor: a molecular perspective*. *Endocrine reviews* 32:3-30.
- Maher E. R. (2013). *Genomics and epigenomics of renal cell carcinoma*. *Seminars in cancer biology* 23:10-17.
- Maher E. R., Neumann H. P. and Richard S. (2011). *von Hippel-Lindau disease: a clinical and scientific review*. *European journal of human genetics : EJHG* 19:617-623.
- Marie P. J. (2012). *Signaling pathways affecting skeletal health*. *Current osteoporosis reports* 10:190-198.
- Marshall W. J. and Bangert S. K. 2005. *Clinical Chemistry*, vol. Sixth Edition.
- Merseburger A. S. and Kuczyk M. A. (2008). *[Value of targeted therapies for renal cell cancer]*. *Der Urologe. Ausg. A* 47:1303-1310.
- Miedlich S. U., Gama L., Seuwen K., Wolf R. M. and Breitwieser G. E. (2004). *Homology modeling of the transmembrane domain of the human calcium sensing receptor and localization of an allosteric binding site*. *The Journal of biological chemistry* 279:7254-7263.
- Mikami S., Oya M., Mizuno R., Kosaka T., Katsube K. and Okada Y. (2014). *Invasion and metastasis of renal cell carcinoma*. *Medical molecular morphology* 47:63-67.
- Mitra S. K. and Schlaepfer D. D. (2006). *Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells*. *Current opinion in cell biology* 18:516-523.
- Mohan S. and Baylink D. J. (1991). *Bone growth factors*. *Clinical orthopaedics and related research*:30-48.
- Mundy G. R. (1997). *Mechanisms of bone metastasis*. *Cancer* 80:1546-1556.
- Mundy G. R. and Martin T. J. 1993. *Physiology and Pharmacology of Bone*.
- Nasrazadani A. and Van Den Berg C. L. (2011). *c-Jun N-terminal Kinase 2 Regulates Multiple Receptor Tyrosine Kinase Pathways in Mouse Mammary Tumor Growth and Metastasis*. *Genes & cancer* 2:31-45.
- Nemeth E. F., Delmar E. G., Heaton W. L., Miller M. A., Lambert L. D., Conklin R. L., Gowen M., Gleason J. G., Bhatnagar P. K. and Fox J. (2001). *Calcilytic compounds: potent and selective Ca²⁺ receptor antagonists that stimulate secretion of parathyroid hormone*. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 299:323-331.
- Nemeth E. F. and Shoback D. (2013). *Calcimimetic and calcilytic drugs for treating bone and mineral-related disorders*. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 27:373-384.
- Ngo T. C., Wood C. G. and Karam J. A. (2014). *Biomarkers of renal cell carcinoma*. *Urologic oncology* 32:243-251.
- Nguyen D. X., Bos P. D. and Massague J. (2009). *Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization*. *Nature reviews. Cancer* 9:274-284.
- Niessen C. M., Leckband D. and Yap A. S. (2011). *Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation*. *Physiological reviews* 91:691-731.

- Ogata S., Kubota Y., Satoh S., Ito S., Takeuchi H., Ashizuka M. and Shirasuna K. (2006). *Ca²⁺ stimulates COX-2 expression through calcium-sensing receptor in fibroblasts*. Biochemical and biophysical research communications 351:808-814.
- Okada M. (2012). *Regulation of the SRC family kinases by Csk*. International journal of biological sciences 8:1385-1397.
- Oppenheimer S. B. (2006). *Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and new advances*. Acta histochemica 108:327-334.
- Paget S. (1889). *The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889*. Cancer metastasis reviews 8:98-101.
- Papaetis G. S. and Syrigos K. N. (2009). *Sunitinib: a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor in the era of molecular cancer therapies*. BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy 23:377-389.
- Papp S., Fadel M. P., Michalak M. and Opas M. (2008). *Analysis of the suitability of calreticulin inducible HEK cells for adhesion studies: microscopical and biochemical comparisons*. Molecular and cellular biochemistry 307:237-248.
- Patel S. and Woodgett J. (2008). *Glycogen synthase kinase-3 and cancer: good cop, bad cop?* Cancer cell 14:351-353.
- Psaila B. and Lyden D. (2009). *The metastatic niche: adapting the foreign soil*. Nature reviews. Cancer 9:285-293.
- Purandare S. M. and Malhotra G. 2014. Hot melt extruded (hme) pharmaceutical composition of cinacalcet. Google Patents.
- Quarles L. D. (2003). *Extracellular calcium-sensing receptors in the parathyroid gland, kidney, and other tissues*. Current opinion in nephrology and hypertension 12:349-355.
- Rathore V. B., Okada M., Newman P. J. and Newman D. K. (2007). *Paxillin family members function as Csk-binding proteins that regulate Lyn activity in human and murine platelets*. The Biochemical journal 403:275-281.
- Rauch J., Kolch W. and Mahmoudi M. (2012). *Cell type-specific activation of AKT and ERK signaling pathways by small negatively-charged magnetic nanoparticles*. Scientific reports 2:868.
- Ray K., Clapp P., Goldsmith P. K. and Spiegel A. M. (1998). *Identification of the sites of N-linked glycosylation on the human calcium receptor and assessment of their role in cell surface expression and signal transduction*. The Journal of biological chemistry 273:34558-34567.
- Ray K., Fan G. F., Goldsmith P. K. and Spiegel A. M. (1997). *The carboxyl terminus of the human calcium receptor. Requirements for cell-surface expression and signal transduction*. The Journal of biological chemistry 272:31355-31361.
- Reyes-Cruz G., Hu J., Goldsmith P. K., Steinbach P. J. and Spiegel A. M. (2001). *Human Ca²⁺ receptor extracellular domain. Analysis of function of lobe I loop deletion mutants*. The Journal of biological chemistry 276:32145-32151.
- Riccardi D. (2002). *Wellcome Prize Lecture. Cell surface, ion-sensing receptors*. Experimental physiology 87:403-411.
- Riccardi D., Finney B. A., Wilkinson W. J. and Kemp P. J. (2009). *Novel regulatory aspects of the extracellular Ca²⁺-sensing receptor, CaR*. Pflugers Archiv : European journal of physiology 458:1007-1022.

- Riccardi D., Hall A. E., Chattopadhyay N., Xu J. Z., Brown E. M. and Hebert S. C. (1998). *Localization of the extracellular Ca²⁺/polyvalent cation-sensing protein in rat kidney*. The American journal of physiology 274:F611-622.
- Rini B. I. and Atkins M. B. (2009). *Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma*. The lancet oncology 10:992-1000.
- Rodriguez M., Nemeth E. and Martin D. (2005). *The calcium-sensing receptor: a key factor in the pathogenesis of secondary hyperparathyroidism*. American journal of physiology. Renal physiology 288:F253-264.
- Roodman G. D. (2004). *Mechanisms of bone metastasis*. The New England journal of medicine 350:1655-1664.
- Roy R., Yang J. and Moses M. A. (2009). *Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 27:5287-5297.
- Rydzanicz M., Wrzesinski T., Bluysen H. A. and Wesoly J. (2013). *Genomics and epigenomics of clear cell renal cell carcinoma: recent developments and potential applications*. Cancer letters 341:111-126.
- Sahai E. (2007). *Illuminating the metastatic process*. Nature reviews. Cancer 7:737-749.
- Saidak Z., Boudot C., Abdoune R., Petit L., Brazier M., Mentaverri R. and Kamel S. (2009). *Extracellular calcium promotes the migration of breast cancer cells through the activation of the calcium sensing receptor*. Experimental cell research 315:2072-2080.
- Saidak Z., Mentaverri R. and Brown E. M. (2009). *The role of the calcium-sensing receptor in the development and progression of cancer*. Endocrine reviews 30:178-195.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A. R. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74:5463-5467.
- Satcher R. L., Pan T., Cheng C. J., Lee Y. C., Lin S. C., Yu G., Li X., Hoang A. G., Tamboli P., Jonasch E., Gallick G. E. and Lin S. H. (2014). *Cadherin-11 in renal cell carcinoma bone metastasis*. PloS one 9:e89880.
- Schaffner F., Ray A. M. and Dontenwill M. (2013). *Integrin alpha5beta1, the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors*. Cancers 5:27-47.
- Schaller M. D. (2001). *Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein*. Oncogene 20:6459-6472.
- Schluter K., Gassmann P., Enns A., Korb T., Hempling-Bovenkerk A., Holzen J. and Haier J. (2006). *Organ-specific metastatic tumor cell adhesion and extravasation of colon carcinoma cells with different metastatic potential*. The American journal of pathology 169:1064-1073.
- Seyfried T. N. and Huysentruyt L. C. (2013). *On the origin of cancer metastasis*. Critical reviews in oncogenesis 18:43-73.
- Shui I. M., Mucci L. A., Wilson K. M., Kraft P., Penney K. L., Stampfer M. J. and Giovannucci E. (2013). *Common genetic variation of the calcium-sensing receptor and lethal prostate cancer risk*. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology 22:118-126.

- Staeher M., Tullmann C., Nuhn P., Haseke N. and Stief C. G. (2010). [*Systemic therapy of renal cell carcinoma*]. *Der Urologe. Ausg. A* 49:1543-1550; quiz 1551.
- Su D., Stamatakis L., Singer E. A. and Srinivasan R. (2014). *Renal cell carcinoma: molecular biology and targeted therapy*. *Current opinion in oncology* 26:321-327.
- Sugarbaker E. D. (1952). *The organ selectivity of experimentally induced metastases in rats*. *Cancer* 5:606-612.
- Sun Y., Liu W. Z., Liu T., Feng X., Yang N. and Zhou H. F. (2015). *Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis*. *Journal of receptor and signal transduction research*:1-5.
- Swartz M. A. and Lund A. W. (2012). *Lymphatic and interstitial flow in the tumour microenvironment: linking mechanobiology with immunity*. *Nature reviews. Cancer* 12:210-219.
- Tfelt-Hansen J., Chattopadhyay N., Yano S., Kanuparthi D., Rooney P., Schwarz P. and Brown E. M. (2004). *Calcium-sensing receptor induces proliferation through p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase but not extracellularly regulated kinase in a model of humoral hypercalcemia of malignancy*. *Endocrinology* 145:1211-1217.
- Tfelt-Hansen J., MacLeod R. J., Chattopadhyay N., Yano S., Quinn S., Ren X., Terwilliger E. F., Schwarz P. and Brown E. M. (2003). *Calcium-sensing receptor stimulates PTHrP release by pathways dependent on PKC, p38 MAPK, JNK, and ERK1/2 in H-500 cells*. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 285:E329-337.
- Thakur R., Trivedi R., Rastogi N., Singh M. and Mishra D. P. (2015). *Inhibition of STAT3, FAK and Src mediated signaling reduces cancer stem cell load, tumorigenic potential and metastasis in breast cancer*. *Scientific reports* 5:10194.
- Tharmalingam S., Daulat A. M., Antflick J. E., Ahmed S. M., Nemeth E. F., Angers S., Conigrave A. D. and Hampson D. R. (2011). *Calcium-sensing receptor modulates cell adhesion and migration via integrins*. *The Journal of biological chemistry* 286:40922-40933.
- Thuroff J. W. and Roos F. (2015). [*Minimally invasive vs. open surgical procedures in the treatment of renal cell carcinoma*]. *Der Urologe. Ausg. A* 54:231-233.
- Toka H. R. (2014). *New functional aspects of the extracellular calcium-sensing receptor*. *Current opinion in nephrology and hypertension* 23:352-360.
- Tollefson M. K., Thompson R. H., Sheinin Y., Lohse C. M., Cheville J. C., Leibovich B. C. and Kwon E. D. (2007). *Ki-67 and coagulative tumor necrosis are independent predictors of poor outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma and not surrogates for each other*. *Cancer* 110:783-790.
- Tu C. L., Chang W. and Bikle D. D. (2011). *The calcium-sensing receptor-dependent regulation of cell-cell adhesion and keratinocyte differentiation requires Rho and filamin A*. *The Journal of investigative dermatology* 131:1119-1128.
- Valastyan S. and Weinberg R. A. (2011). *Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms*. *Cell* 147:275-292.
- van der Geer P., Wiley S., Gish G. D. and Pawson T. (1996). *The Shc adaptor protein is highly phosphorylated at conserved, twin tyrosine residues (Y239/240) that mediate protein-protein interactions*. *Current biology : CB* 6:1435-1444.
- van Driel M. and van Leeuwen J. P. (2014). *Cancer and bone: A complex complex*. *Archives of biochemistry and biophysics*.

- Vanharanta S. and Massague J. (2013). *Origins of metastatic traits*. *Cancer cell* 24:410-421.
- Vanhouten J. N. and Wysolmerski J. J. (2013). *The calcium-sensing receptor in the breast*. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 27:403-414.
- Wagner E. F. and Nebreda A. R. (2009). *Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development*. *Nature reviews. Cancer* 9:537-549.
- Wang C., Cigliano A., Delogu S., Armbruster J., Dombrowski F., Evert M., Chen X. and Calvisi D. F. (2013). *Functional crosstalk between AKT/mTOR and Ras/MAPK pathways in hepatocarcinogenesis: implications for the treatment of human liver cancer*. *Cell cycle* 12:1999-2010.
- Wang Y., Wang X., Zhang Y., Yang S., Wang J., Zhang X. and Zhang Q. (2009). *RGD-modified polymeric micelles as potential carriers for targeted delivery to integrin-overexpressing tumor vasculature and tumor cells*. *Journal of drug targeting* 17:459-467.
- Waning D. L. and Guise T. A. (2014). *Molecular Mechanisms of Bone Metastasis and Associated Muscle Weakness*. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*.
- Weis S. M. and Cheresh D. A. (2005). *Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability*. *Nature* 437:497-504.
- Wirtz D. (2009). *Particle-tracking microrheology of living cells: principles and applications*. *Annual review of biophysics* 38:301-326.
- Xue G. and Hemmings B. A. (2013). *PKB/Akt-dependent regulation of cell motility*. *Journal of the National Cancer Institute* 105:393-404.
- Yoneda T. and Hiraga T. (2005). *Crosstalk between cancer cells and bone microenvironment in bone metastasis*. *Biochemical and biophysical research communications* 328:679-687.
- Zhang Z., Sun S., Quinn S. J., Brown E. M. and Bai M. (2001). *The extracellular calcium-sensing receptor dimerizes through multiple types of intermolecular interactions*. *The Journal of biological chemistry* 276:5316-5322.
- Zhao S., Li H., Wang Q., Su C., Wang G., Song H., Zhao L., Luan Z. and Su R. (2015). *The role of c-Src in the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells induced by association of cell surface GRP78 with activated alpha2M*. *BMC cancer* 15:389.
- Zhao X. M., Hauache O., Goldsmith P. K., Collins R. and Spiegel A. M. (1999). *A missense mutation in the seventh transmembrane domain constitutively activates the human Ca²⁺ receptor*. *FEBS letters* 448:180-184.
- Znaor A., Lortet-Tieulent J., Laversanne M., Jemal A. and Bray F. (2014). *International Variations and Trends in Renal Cell Carcinoma Incidence and Mortality*. *European urology*.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

α	alpha	DPBS	Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline
Abb.	Abbildung	DTT	Dithiothreitol
abs.	absolut	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ad.	zu	EGF	Epidermal Growth Factor
AG	Arbeitsgruppe	ELISA	Ezyme Linked Immunosorbent Assay
AKT	Proteinkinase B	Elk-1	E twenty-six (ETS)-like transcription factor
Asp	Aminosäure: Asparaginsäure	ERK	Extracellular-signal Related Kinase
APS	Ammoniumperoxidsulfat	ER	Endoplasmatisches Retikulum
β	beta	et al.	et aliae - und andere
Ba ²⁺	Barium	ET-1	Endothelin 1
Be ²⁺	Beryllium	EZM	Extrazellular-Matrix
bp	Basenpaare	Fa.	Firma
BrdU	Bromdesoxyuracil	FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
BSA	Bovines Serum Albumin	FAK	Fokale Adhäsionskinase
bzw.	Beziehungsweise	FCS	fetal calf serum - Fötales Kälberserum
c	Konzentration	FDA	Federal Drug Administration
C	Celsius	FGF	Fibroblast Growth-Factor
ca.	circa	FSC	Front Scatter
CaSR	Calcium-sensitiver Rezeptor	G1-3	(Tumor-) Grading 1-3
CdKs	Cyclin dependent Kinases	Gd3+	Gadolinium
cDNA	complementary DNA	GLUT1	Glucose transporter 1
c-Jun	Transkriptionsfaktor	GPCR	G-Protein-coupled receptor
c-Met	Hepatocyte growth factor receptor	Grb2	growth-factor-receptor-binding-protein 2
CO ₂	Kohlendioxid	GTP	Guanosin Triphosphat
c-RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma	HCl	Hydrochloric Acid /Salzsäure
CREB	cAMP response element-binding protein		
DAG	Diacylglycerol		
ddNTPs	Didesoxynukleotid-Triphosphate		
DMSO	Dimethyl Sulfoxid		
DNA	Desoxyribonukleinsäure		
dNTPS	Desoxynukleotid-Triphosphate		

Anhang

HE - Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	NaCL	Natrium-Chlorid / Kochsalz
HEK	Human Embryonic Kidney	NFκB	nuclear factor κB
HIF	Hypoxia-inducible factor	NPS2143	Inhibitor des CaSR
HRP	Horse Raddish Peroxidase	NZK	Nierenzellkarzinom
HUVEC	Human Umbelical Vein Endothelial Cells	OD	optische Dichte
IFN	Interferon	p21	Protein 21 kDa. cyclin- dependent kinase inhibitor 1
IGF	Insulin-like growth factor	p27	Protein 27 kDa. cyclin- dependent kinase inhibitor 1B
IL-2	Interleukin 2		
InDel	Insertions / Deletions		
IP-3	Inositol-Trisphosphat	p53	Protein 53 kDa. Tumor Protein 53
JNK	c-Jun NH2-terminale Kinase		
kDa	Kilo Dalton	P90RSK	ribosomal s6 kinase
Ki-67	Marker-Protein 67 (Ki = Kiel)	PCR	Polymerase chain reaction / Polymerase Kettenreaktion
Ko	Kontrolle		
La ²⁺	Lanthan	PDGF	Plateled Derived Growth Factor
MAPK	Mitogen-activated- proteinkinase		
Mdm2	murine double minute 2	PDGFR	Plateled Derived Growth Factor Receptor
MDR	Multi-Drug-Resistance (- Protein)	PDK-1	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase		
MgCl ₂	Magnesiumchlorid	PFA	Paraformaldehyd
MgSO ₄	Magnesiumsulfat		
miRNA	micro RNA	PFS	progression-free survival - Progressionsfreies Überleben
MKI	Multi-Kinase Inhibitor		
MMLV	Moloney Mäuseleukämievirus	Phe	Phenylalanin
mNZK	metastasierendes Nierenzellkarzinom	PI	Propidium Jodid
Monocl.	Monoclonal	PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
MOPS	3-(N- Morpholino)propansulfonsäure	PIP2	Phosphatidylinositol 4,5- bisphosphate
mRNA	messenger Ribo Nucleic Acid	PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)- triphosphate
		PKA	Proteinkinase A
mTOR	mammalian Target of Rapamycin	PKB	Proteinkinase B

Anhang

PKC	Proteinkinase C	SOCS	Suppressors of Cytokine Signaling
PLC	Phospholipase C		
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	SOS	Son of Sevenless
Polycl.	Polyclonal	SRC	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase. Sarcoma
PP	Polypropylen	SSC	Side Scatter
PS	Polystyrol		
	Phosphatase and Tensin	STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
PTEN	Homolog deleted in chromosome 10	Taq	Thermus aquaticus
		TBE	TRIS-Borat-EDTA
PTH	Parathormon	TBS	Tris-buffered Saline
		TBST	TBS + Tween 20
PTHrP	parathyroid hormone-related protein	TEMED	Tetramethylethylendiamin
RAF	rapidly growing fibrosarcoma	TGF-beta	tumor growth factor beta
		Thr	Threonin
RANK	receptor activator for nuclear factor κ B	TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor(en)
			Tumor, Node, Metastasis
RANKL	receptor activator for nuclear factor κ B Ligand	TNM	Klassifikation maligner Tumoren
Ras	rat-sarcoma		
		TNM	Tumor, Nodes, Metastasis - Klassifizierung
Rbx	ring box protein		
RHEB	Ras homolog enriched in brain	Tyr	Tyrosin
Rho	Ras homologue		
		UICC	Union for International Cancer Control
RNA	Ribo Nucleic Acid - Ribonucleinsäure		
		üN	über Nacht
RNA	Ribonucleinsäure		
		VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
rpm	rounds per minute - Umdrehungen pro Minute	VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor
rRNA	ribosomale RNA		
		VHL	von Hippel-Lindau
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase(n)	VTP	Venus-Flytrap
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat		
Sek.	Sekunde(n)		
Ser	Serin		
SH2	SRC homology 2 Domain		
SH3	SRC homology 3 Domain		
SOB	Super Optimal Broth		
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression		

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Inzidenzraten des Nierenzellkarzinoms weltweit.....	1
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Nephron-/Sammelrohrsystems.....	3
Abbildung 3: Wirkung von aktivem und inaktivem VHL.....	5
Abbildung 4: Hauptmetastasierungsorte des NZK.....	7
Abbildung 5: Schematische Darstellung des VEGF- und PDGF-Rezeptor-Signalwegs mit Wirkungsstellen der TKI Sorafenib, Sunitinib, Pazopanib und Axitinib.....	10
Abbildung 6: Die Metastasierung als <i>Multistep</i> -Prozess.....	13
Abbildung 7: Schematische Darstellung der intrazellulären Signalwege, die an der Metastasierung von Tumorzellen beteiligt sind.....	16
Abbildung 8: Verteilung der Metastasenhäufigkeit bei Brust-, Kolorektal-, Prostata- und Nierenkarzinom mit prozentualer Häufigkeit der Ausbildung von Metastasen der Lunge, Leber, Knochen und dem Hirn.....	17
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Calcium-sensitiven Rezeptors mit extrazellulärer N-terminaler Domäne, sieben transmembranen α -Helices und intrazellulärer C-terminaler Domäne.....	20
Abbildung 10: Schematische Darstellung des <i>Circulus Vitiosus</i>	26
Abbildung 11: Schematische Darstellung der intrazellulären Signalwege, die durch den CaSR aktiviert werden.....	28
Abbildung 12: Schematische Darstellung des für die Transfektion verwendeten pcDNA3-Vektors mit Antibiotikaresistenzgen (Ampicillin/Neomycin) <i>multi-purpose cloning site</i> und Expressionsmodulen.....	36
Abbildung 13 Schematischer Aufbau des Western Blots.....	66
Abbildung 14: Schematische Darstellung einer Boyden Migrations-Kammer.....	73
Abbildung 15: Sequenz des CaSR inklusive ORF.....	78
Abbildung 16: Sequenz des CaSR inklusive ORF nach Durchführung der <i>Outer</i> PCR.....	80
Abbildung 17: Auswertung eines Agarosegel-Bildes nach der <i>Nested</i> PCR.....	81
Abbildung 18: PCR zum Nachweis des transgenen CaSR.....	83
Abbildung 19: Western Blot zum Nachweis des transgenen CaSR.....	84
Abbildung 20: Zweidimensionale Histogramme der durchflusszytometrischen Untersuchungen der Zelllinie 786-O.....	85
Abbildung 21: Zweidimensionale Histogramme der durchflusszytometrischen Untersuchungen der Zelllinie HEK-293.....	86
Abbildung 22: Adhäsion der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen an Komponenten der EZM (Fibronektin, Kollagen I und IV, BSA als Kontrolle (je 10 μ g/ml)).....	89
Abbildung 23: Adhäsion der CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen an Komponenten der EZM (Fibronektin, Kollagen I und IV, BSA als Kontrolle (je 10 μ g/ml)).....	90
Abbildung 24: Migration der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen.....	91
Abbildung 25: Migration der CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen.....	92
Abbildung 26: Adhäsion der transfizierten 786-O-Zellen an HUVEC.....	93
Abbildung 27: Proliferation der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen.....	94

Abbildung 28: Proliferation der CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen	94
Abbildung 29: Vitalitätstest (MTT) der Zelllinie 786-O WT zur Bestimmung der optimalen Behandlungskonzentration der Substanzen NPS2143 und Cinacalcet	96
Abbildung 30: Vitalitätstest (MTT) der Zelllinie HEK-293 WT zur Bestimmung der optimalen Behandlungskonzentration der Substanzen NPS2143 und Cinacalcet	96
Abbildung 31: Adhäsion der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen an Fibronektin und Kollagen I nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min), NPS2143 (10 µM - 1 Std.), Cinacalcet (10 µM - 1 Std.) oder Kombinationen daraus	99
Abbildung 32: Adhäsion der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen an Kollagen IV und BSA nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min), NPS2143 (10 µM - 1 Std.), Cinacalcet (10 µM - 1 Std.) oder Kombinationen daraus	100
Abbildung 33: Adhäsion der CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen an Fibronektin und Kollagen I nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min), NPS2143 (10 µM - 1 Std.), Cinacalcet (10 µM - 1 Std.) oder Kombinationen daraus	102
Abbildung 34: Adhäsion der CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen an Kollagen IV und BSA nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min), NPS2143 (10 µM - 1 Std.), Cinacalcet (10 µM - 1 Std.) oder Kombinationen daraus	103
Abbildung 35: Migration der CaSR-transfizierten 786-O Zellen mit Hilfe des Lockstoffs Calcium (10 mM) nach Behandlung mit NPS2143 (10 µM - 1 Std.) oder Cinacalcet (10 µM - 1 Std.)	105
Abbildung 36: Adhäsion der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen an Endothel (HUVEC).	107
Abbildung 37: Proliferation der CaSR-transfizierten 786-O Zellen nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min.), NPS2143 (10 µM - 1 Std.) oder einer Kombination daraus	109
Abbildung 38: Proliferation der CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min.), NPS2143 (10 µM - 1 Std.) oder einer Kombination daraus	110
Abbildung 39: Phospho Kinase-Array des CaSR-transfizierten Klons CaSR1 sowie des Leervektor- transfizierten Klons als Kontrolle nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min.) oder Kombination aus Calcium + NPS2143 (10 µM - 1 Std.) bzw. Cinacalcet (10 µM - 1 Std.)	112
Abbildung 40: Western Blot ERK1/2/phospho ERK1/2 der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min.), NPS2143 (10 µM - 1 Std.) oder Cinacalcet (10 µM - 1 Std.) bzw. Kombinationen daraus.	115
Abbildung 41: Western Blot ERK1/2/phospho ERK1/2 der CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min.), NPS2143 (10 µM - 1 Std.) oder Cinacalcet (10 µM - 1 Std.) bzw. Kombinationen daraus.	117
Abbildung 42: Western Blot von Gesamt AKT/phospho AKT der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min.), NPS2143 (10 µM - 1 Std.) oder Cinacalcet (10 µM - 1 Std.) bzw. Kombinationen daraus.	119
Abbildung 43: Western Blot von phospho SAP/JNK und phospho P90RSK der CaSR-transfizierten 786-O- Zellen nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min.), NPS2143 (10 µM - 1 Std.) oder Cinacalcet (10 µM - 1 Std.) bzw. Kombinationen daraus.	121
Abbildung 44: Western Blot von phospho SAP/JNK der CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min.), NPS2143 (10 µM - 1 Std.) oder Cinacalcet (10 µM - 1 Std.) bzw. Kombinationen daraus.	123
Abbildung 45: Western Blot von phospho Paxillin und phospho SHC der CaSR-transfizierten 786-O- Zellen nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min.), NPS2143 (10 µM - 1 Std.) oder Cinacalcet (10 µM - 1 Std.) bzw. Kombinationen daraus.	125

Abbildung 46: Western Blot von phospho Paxillin und phospho SHC der CaSR-transfizierten HEK-293-Zellen nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min.), NPS2143 (10 µM - 1 Std.) oder Cinacalcet (10 µM - 1 Std.) bzw. Kombinationen daraus.	127
Abbildung 47: Western Blot von phospho SRC und phospho CREB der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen nach Behandlung mit Calcium (10 mM - 30 Min.), NPS2143 (10 µM - 1 Std.) oder Cinacalcet (10 µM - 1 Std.) bzw. Kombinationen daraus.	129
Abbildung 48: Intrazelluläre Signalwege der CaSR-transfizierten Zellen.....	144
Abbildung 49: Möglicher Signalweg nach Aktivierung des CaSR durch Calcium.	147
Abbildung 50: Möglicher Signalweg für SHC nach Aktivierung des CaSR via Calcium.....	152
Abbildung 51: Möglicher Signalweg der Kinase Paxillin nach Calcium-Behandlung.....	153
Abbildung 52: Möglicher Signalweg von SRC nach Calcium-Behandlung.	154
Abbildung 53: Zusammenfassung der Signalwege, die zu einem hypothetischen <i>Vicious Cycle</i> des NZK führen könnten.....	156

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pipettierschema für den PCR-Ansatz der <i>Outer</i> PCR für 50 µl	41
Tabelle 2: Temperatureinstellungen des Block-Cycler Programms für die <i>Outer</i> PCR	42
Tabelle 3: Pipettierschema für den PCR-Ansatz der <i>Inner/Nested</i> PCR für 50 µl	42
Tabelle 4: Temperatureinstellungen des Block-Cycler Programms für die <i>Inner/Nested</i> PCR.....	43
Tabelle 5: Pipettierschema für die Standard PCR für den Nachweis des CaSR (25 µl).....	43
Tabelle 6: Temperatureinstellungen des Block-Cycler Programms für den Nachweis des CaSR mit Hilfe der PCR	43
Tabelle 7: Pipettierschema für den Sequenzierungs-Ansatz (10 µl)	44
Tabelle 8: Temperatureinstellungen des Block-Cycler Programms für die Sequenzierungs-Reaktion	44
Tabelle 9: Pipettierschema des <i>Mastermix</i> für die PCR des Mykoplasmen-Tests (25 µl)	45
Tabelle 10: Temperatureinstellungen des Block-Cycler Programms für den Mykoplasmen-Test.....	46
Tabelle 11: Pipettierschema für den <i>Mastermix</i> der Reversen Transkriptase-Reaktion	55
Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse der Migrations- und Adhäsions-Analysen der CaSR-transfizierten Zellen ohne Behandlung.....	132
Tabelle 13: Übersicht über die Ergebnisse der Adhäsion CaSR-transfizierter 786-O-Zellen an Komponenten der EZM nach verschiedenen Behandlungen.	135
Tabelle 14: Übersicht über die Ergebnisse der Adhäsion CaSR-transfizierter 786-O-Zellen an HUVEC (Endothel) nach verschiedenen Behandlungen.	136
Tabelle 15: Übersicht über die Ergebnisse der Adhäsion CaSR-transfizierter HEK-293-Zellen an Komponenten der EZM nach verschiedenen Behandlungen.	137
Tabelle 16: Darstellung der Ergebnisse der Migration (Chemotaxin Calcium) nach Behandlung der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen.	139
Tabelle 17: Darstellung der Ergebnisse der Proliferation der CaSR-transfizierten 786-O-Zellen nach unterschiedlichen Behandlungen.	140

Tabelle 18: Einfluss einer erhöhten CaSR-Expression auf intrazelluläre Signalwege (Phospho Kinase-Array) 142

Tabelle 19: Einfluss einer erhöhten CaSR-Expression auf intrazelluläre Signalwege (Western Blot der Zelllinie 786-O)..... 143

Tabelle 20: Einfluss einer erhöhten CaSR-Expression auf intrazelluläre Signalwege (Western Blot der Zelllinie HEK-293) 148

8.4 Werte zu den Abbildungen

Werte zu **Abbildung 22** und **Abbildung 31**

Adhäsion (786-O) an Fibronektin	Behandlung	MW	StdAbw	pcDNA3 HM = 100 %	StdAbw in %
WT	HM	0,272	0,062	118,3	22,8
pcDNA3	HM	0,230	0,093	100	40,4
	Ca ²⁺	0,214	0,088	93,2	41,3
	NPS	0,200	0,075	87,1	37,7
	NPS + Ca ²⁺	0,200	0,095	87,3	47,2
	Cina + Ca ²⁺	0,223	0,114	97,3	50,9
CaSR1	HM	0,310	0,100	135,1	32,2
	Ca ²⁺	0,582	0,125	253,5	21,5
	NPS	0,297	0,050	129,2	17,0
	NPS + Ca ²⁺	0,256	0,089	111,5	34,7
	Cina + Ca ²⁺	0,580	0,075	252,8	12,9
CaSR4	HM	0,326	0,053	142,0	16,1
	Ca ²⁺	0,668	0,173	291,1	25,8
	NPS	0,389	0,115	169,4	29,6
	NPS + Ca ²⁺	0,300	0,103	130,7	34,2
	Cina + Ca ²⁺	0,577	0,093	251,1	16,2
CaSR9	HM	0,298	0,056	129,7	18,6
	Ca ²⁺	0,561	0,148	244,5	26,3
	NPS	0,332	0,070	144,8	21,0
	NPS + Ca ²⁺	0,280	0,081	121,9	29,0
	Cina + Ca ²⁺	0,556	0,080	242,3	14,4

Anhang

Werte zu **Abbildung 22** und **Abbildung 31**

Adhäsion (786-O) an Kollagen I	Behandlung	MW	StdAbw	pcDNA3 HM = 100 %	StdAbw in %
WT	HM	0,189	0,082	105,9	43,7
pcDNA3	HM	0,178	0,060	100	33,7
	Ca ²⁺	0,229	0,155	128,5	67,6
	NPS	0,207	0,116	116,5	55,8
	NPS + Ca ²⁺	0,204	0,127	114,6	62,4
	Cina + Ca ²⁺	0,207	0,142	116,2	68,8
CaSR1	HM	0,197	0,079	110,9	39,9
	Ca ²⁺	0,587	0,194	329,7	33,1
	NPS	0,252	0,057	141,3	22,6
	NPS + Ca ²⁺	0,232	0,085	130,5	36,7
	Cina + Ca ²⁺	0,462	0,138	259,7	29,9
CaSR4	HM	0,224	0,093	125,7	41,4
	Ca ²⁺	0,605	0,140	340,1	23,2
	NPS	0,344	0,095	193,0	27,7
	NPS + Ca ²⁺	0,304	0,064	170,6	21,1
	Cina + Ca ²⁺	0,455	0,041	255,4	9,1
CaSR9	HM	0,224	0,117	125,9	52,4
	Ca ²⁺	0,519	0,088	291,3	17,0
	NPS	0,271	0,058	152,3	21,4
	NPS + Ca ²⁺	0,251	0,041	140,9	16,3
	Cina + Ca ²⁺	0,456	0,104	256,0	22,8

Werte zu **Abbildung 22** und **Abbildung 32**

Adhäsion (786-O) an Kollagen IV	Behandlung	MW	StdAbw	pcDNA3 HM = 100 %	StdAbw in %
WT	HM	0,462	0,119	124,4	25,8
pcDNA3	HM	0,372	0,110	100	29,5
	Ca ²⁺	0,367	0,133	98,7	36,3
	NPS	0,419	0,123	112,9	29,3
	NPS + Ca ²⁺	0,355	0,118	95,6	33,3
	Cina + Ca ²⁺	0,445	0,158	119,6	35,6
CaSR1	HM	0,309	0,060	83,0	19,6
	Ca ²⁺	0,273	0,086	73,5	31,5
	NPS	0,347	0,109	93,3	31,3
	NPS + Ca ²⁺	0,308	0,088	82,8	28,7
	Cina + Ca ²⁺	0,365	0,102	98,3	27,8
CaSR4	HM	0,382	0,150	102,9	39,1
	Ca ²⁺	0,370	0,094	99,6	25,3
	NPS	0,446	0,124	120,0	27,8
	NPS + Ca ²⁺	0,378	0,133	101,6	35,2
	Cina + Ca ²⁺	0,417	0,180	112,3	43,1

Anhang

CaSR9	HM	0,322	0,103	86,8	31,9
	Ca²⁺	0,332	0,081	89,3	24,3
	NPS	0,401	0,111	107,8	27,8
	NPS + Ca²⁺	0,336	0,093	90,5	27,7
	Cina + Ca²⁺	0,362	0,117	97,4	32,3

Werte zu **Abbildung 22** und **Abbildung 32**

Adhäsion (786-O) an BSA	Behandlung	MW	StdAbw	pcDNA3 HM = 100 %	StdAbw in %
WT	HM	0,373	0,211	85,6	56,5
pcDNA3	HM	0,436	0,186	100	42,6
	Ca²⁺	0,475	0,179	109,0	37,8
	NPS	0,455	0,159	104,4	35,0
	NPS + Ca²⁺	0,413	0,128	94,6	30,9
	Cina + Ca²⁺	0,419	0,224	96,1	53,6
CaSR1	HM	0,310	0,051	71,1	16,5
	Ca²⁺	0,350	0,104	80,3	29,8
	NPS	0,357	0,089	81,8	24,9
	NPS + Ca²⁺	0,364	0,069	83,5	18,9
	Cina + Ca²⁺	0,309	0,088	70,9	28,6
CaSR4	HM	0,395	0,114	90,7	28,9
	Ca²⁺	0,396	0,088	90,8	22,3
	NPS	0,423	0,149	97,0	35,3
	NPS + Ca²⁺	0,466	0,186	106,9	39,9
	Cina + Ca²⁺	0,473	0,175	108,4	37,0
CaSR9	HM	0,336	0,091	77,0	27,0
	Ca²⁺	0,345	0,079	79,2	23,0
	NPS	0,357	0,094	82,0	26,3
	NPS + Ca²⁺	0,367	0,095	84,2	26,0
	Cina + Ca²⁺	0,375	0,084	86,0	22,4

Anhang

Werte zu **Abbildung 23** und **Abbildung 33**

Adhäsion (HEK-293) an Fibronektin	Behandlung	MW	StdAbw	pcDNA3 HM = 100 %	StdAbw in %
WT	HM	0,415	0,092	86,6	22,2
pcDNA3	HM	0,479	0,101	100	21,1
	Ca ²⁺	0,376	0,210	78,5	55,8
	NPS	0,408	0,103	85,2	25,1
	NPS + Ca ²⁺	0,430	0,230	89,8	53,6
	Cina + Ca ²⁺	0,387	0,150	80,7	38,7
CaSR1	HM	0,269	0,057	56,1	21,3
	Ca ²⁺	0,792	0,215	165,3	27,2
	NPS	0,336	0,111	70,1	33,1
	NPS + Ca ²⁺	0,316	0,097	66,0	30,5
	Cina + Ca ²⁺	0,843	0,187	175,8	22,2
CaSR4	HM	0,444	0,164	92,7	36,9
	Ca ²⁺	0,769	0,168	160,4	21,9
	NPS	0,444	0,154	92,6	34,6
	NPS + Ca ²⁺	0,364	0,116	76,0	31,7
	Cina + Ca ²⁺	0,794	0,179	165,6	22,6

Werte zu **Abbildung 23** und **Abbildung 33**

Adhäsion (HEK-293) an Kollagen I	Behandlung	MW	StdAbw	pcDNA3 HM = 100 %	StdAbw in %
WT	HM	0,341	0,049	84,8	14,3
pcDNA3	HM	0,402	0,070	100	17,3
	Ca ²⁺	0,312	0,108	77,7	34,6
	NPS	0,380	0,201	94,5	52,9
	NPS + Ca ²⁺	0,325	0,107	80,8	32,9
	Cina + Ca ²⁺	0,394	0,091	97,9	23,2
CaSR1	HM	0,270	0,060	67,0	22,2
	Ca ²⁺	0,364	0,127	90,6	34,8
	NPS	0,299	0,079	74,3	26,5
	NPS + Ca ²⁺	0,384	0,141	95,5	36,7
	Cina + Ca ²⁺	0,368	0,104	91,5	28,4
CaSR4	HM	0,365	0,111	90,8	30,3
	Ca ²⁺	0,299	0,058	74,4	19,3
	NPS	0,316	0,118	78,6	37,3
	NPS + Ca ²⁺	0,368	0,164	91,4	44,7
	Cina + Ca ²⁺	0,341	0,137	84,9	40,1

Anhang

Werte zu **Abbildung 23** und **Abbildung 34**

Adhäsion (HEK-293) an Kollagen IV	Behandlung	MW	StdAbw	pcDNA3 HM = 100 %	StdAbw in %
WT	HM	0,413	0,177	143,4	42,8
pcDNA3	HM	0,288	0,038	100	13,4
	Ca ²⁺	0,393	0,164	136,8	41,6
	NPS	0,388	0,202	134,9	52,2
	NPS + Ca ²⁺	0,375	0,161	130,3	43,0
	Cina + Ca ²⁺	0,372	0,200	129,4	53,7
CaSR1	HM	0,292	0,085	101,4	29,2
	Ca ²⁺	0,414	0,215	143,9	51,9
	NPS	0,327	0,110	113,8	33,6
	NPS + Ca ²⁺	0,326	0,125	113,5	38,2
	Cina + Ca ²⁺	0,350	0,127	121,6	36,3
CaSR4	HM	0,326	0,124	113,5	37,9
	Ca ²⁺	0,324	0,042	112,8	13,0
	NPS	0,326	0,088	113,2	27,0
	NPS + Ca ²⁺	0,364	0,132	126,4	36,2
	Cina + Ca ²⁺	0,396	0,114	137,7	28,8

Werte zu **Abbildung 23** und **Abbildung 34**

Adhäsion (HEK-293) an BSA	Behandlung	MW	StdAbw	pcDNA3 HM = 100 %	StdAbw in %
WT	HM	0,363	0,116	78,8	32,1
pcDNA3	HM	0,460	0,194	100	42,1
	Ca ²⁺	0,319	0,101	69,5	31,6
	NPS	0,312	0,117	67,8	37,4
	NPS + Ca ²⁺	0,311	0,110	67,7	35,4
	Cina + Ca ²⁺	0,295	0,118	64,2	40,0
CaSR1	HM	0,278	0,059	60,4	21,4
	Ca ²⁺	0,270	0,081	58,7	30,2
	NPS	0,325	0,072	70,6	22,1
	NPS + Ca ²⁺	0,282	0,070	61,3	24,8
	Cina + Ca ²⁺	0,383	0,145	83,3	37,9
CaSR4	HM	0,304	0,127	66,0	41,7
	Ca ²⁺	0,328	0,099	71,4	30,1
	NPS	0,319	0,098	69,4	30,8
	NPS + Ca ²⁺	0,423	0,249	91,9	59,0
	Cina + Ca ²⁺	0,339	0,131	73,6	38,6

Anhang

Werte zu **Abbildung 26** und **Abbildung 36**

Adhäsion (786-O) an HUVEC	Behandlung	MW	Stdabw	pcDNA3 HM = 100 %	StdAbw in %
WT	HM	33,5	11,6	105,7	34,7
	Ca ²⁺	44,1	22,1	139,4	50,1
	NPS+ Ca ²⁺	31,4	13,0	99,2	41,4
pcDNA3	HM	31,7	4,9	100,0	15,4
	Ca ²⁺	35,2	13,7	111,1	38,9
	NPS+ Ca ²⁺	25,5	10,0	80,6	39,2
CaSR1	HM	39,1	25,6	123,5	65,5
	Ca ²⁺	171,3	49,9	541,0	29,1
	NPS+ Ca ²⁺	29,8	23,3	94,1	78,1
CaSR4	HM	37,9	16,2	119,7	42,7
	Ca ²⁺	191,7	58,8	605,4	30,7
	NPS+ Ca ²⁺	34,0	16,1	107,3	47,5
CaSR9	HM	53,4	17,7	168,7	33,2
	Ca ²⁺	189,4	66,2	598,4	35,0
	NPS+ Ca ²⁺	38,1	12,3	120,5	32,3

Werte zu **Abbildung 24**

Migration (786-O)	Chemotaxin	MW	StdAbw	pcDNA3 HM = 100%	StdAbw in %
WT	HM	0,45	0,90	36,4	94,9
	Fibronectin (10 µM)	1,74	1,22	140,4	129,0
pcDNA3	HM	1,24	0,95	100,0	
	Fibronectin (10 µM)	1,03	0,49	83,3	51,8
CaSR1	HM	1,15	0,89	92,9	93,6
	Fibronectin (10 µM)	18,96	6,57	1532,0	693,2
CaSR4	HM	0,32	0,44	25,8	46,0
	Fibronectin (10 µM)	49,34	18,71	3987,2	1972,9
CaSR9	HM	0,49	0,31	39,9	32,8
	Fibronectin (10 µM)	30,62	3,83	2474,1	403,7

Werte zu **Abbildung 25**

Migration (HEK-293)	Chemotaxin	Werte
WT	HM	0
	Fibronectin (10 µM)	0,9
pcDNA3	HM	0
	Fibronectin (10 µM)	0,45
CaSR1	HM	0
	Fibronectin (10 µM)	48,325
CaSR4	HM	0
	Fibronectin (10 µM)	31,325

Anhang

Werte zu **Abbildung 35**

Migration (786-O)	Behandlung	Chemotaxin	MW	StdAbw	pcDNA3 HM = 100%	StdAbw in %
WT	X	HM	0,45	0,90	36	95
	X	Ca ²⁺ (10mM)	0,73	1,07	59	113
	NPS2143 (10 µM)	Ca ²⁺ (10mM)	0,07	0,05	5	5
	Cinacalcet (10 µM)	Ca ²⁺ (10mM)	0,17	0,17	14	18
pcDNA3	X	HM	1,24	0,95	100	100
	X	Ca ²⁺ (10mM)	0,71	0,90	58	95
	NPS2143 (10 µM)	Ca ²⁺ (10mM)	1,08	0,80	87	85
	Cinacalcet (10 µM)	Ca ²⁺ (10mM)	0,62	0,52	50	55
CaSR1	X	HM	1,15	0,89	93	94
	X	Ca ²⁺ (10mM)	44,96	20,05	3633	2115
	NPS2143 (10 µM)	Ca ²⁺ (10mM)	1,41	2,83	114	298
	Cinacalcet (10 µM)	Ca ²⁺ (10mM)	7,74	7,42	626	783
CaSR4	X	HM	0,32	0,44	26	46
	X	Ca ²⁺ (10mM)	50,79	7,99	4105	842
	NPS2143 (10 µM)	Ca ²⁺ (10mM)	0,81	1,42	66	149
	Cinacalcet (10 µM)	Ca ²⁺ (10mM)	46,73	9,09	3776	958
CaSR9	X	HM	0,49	0,31	40	33
	X	Ca ²⁺ (10mM)	65,71	7,73	5310	815
	NPS2143 (10 µM)	Ca ²⁺ (10mM)	0,35	0,59	28	62
	Cinacalcet (10 µM)	Ca ²⁺ (10mM)	20,35	2,65	1644	280

Werte zu **Abbildung 27** und **Abbildung 37**

Proliferation (786-O)	Behandlung	MW	StdAbw	pcDNA3 HM =100%	StdAbw in %
WT	HM	1,1	0,3	103	24
pcDNA3	HM	1,0	0,3	100	27
	Ca ²⁺	1,1	0,3	103	31
	NPS2143+ Ca ²⁺	0,4	0,1	42	25
	NPS2143	0,4	0,1	36	32
CaSR1	HM	1,0	0,1	100	10
	Ca ²⁺	1,6	0,2	159	11
	NPS2143+ Ca ²⁺	0,8	0,2	82	25
	NPS2143	0,6	0,1	63	8
CaSR4	HM	1,0	0,1	98	5
	Ca ²⁺	1,7	0,1	162	6
	NPS2143+ Ca ²⁺	0,8	0,2	77	23
	NPS2143	0,7	0,2	65	33
CaSR9	HM	1,0	0,1	94	14
	Ca ²⁺	1,6	0,1	152	9
	NPS2143+ Ca ²⁺	0,6	0,2	57	31
	NPS2143	0,5	0,1	50	18

Anhang

Werte zu **Abbildung 28** und **Abbildung 38**

Proliferation (HEK-293)	Behandlung	MW	StdAbw	pcDNA3 HM =100%	StdAbw in %
WT	HM	1,16	0,20	99	17
pcDNA3	HM	1,16	0,02	100	1
	Ca ²⁺	1,49	0,32	128	22
	NPS2143+ Ca ²⁺	0,70	0,06	60	8
	NPS2143	0,78	0,32	67	41
CaSR1	HM	1,25	0,18	107	15
	Ca ²⁺	1,60	0,05	138	3
	NPS2143+ Ca ²⁺	1,23	0,00	106	0
	NPS2143	0,77	0,52	66	68
CaSR4	HM	1,43	0,52	123	36
	Ca ²⁺	1,66	0,21	142	13
	NPS2143+ Ca ²⁺	1,34	0,41	115	30
	NPS2143	1,01	0,01	87	1

Werte zu **Abbildung 29**

MTT (786-O) NPS2143-Test	MW	Stdabw	Ko = 100 %	StdAbw in %
Ko	0,5	0,1	100	13
100 nm	0,5	0,0	98	9
500 nm	0,5	0,1	105	14
1 µM	0,5	0,0	99	7
5 µm	0,5	0,0	101	8
10 µM	0,5	0,0	96	9
20 µM	0,3	0,0	67	6
50 µM	0,2	0,0	38	14
100 µM	0,1	0,0	19	12
MTT (786-O) Cinacalcet-Test	MW	Stdabw	Ko = 100 %	StdAbw in %
Ko	0,6	0,1	100	16
100 nm	0,6	0,1	104	10
500 nm	0,5	0,1	97	20
1 µM	0,6	0,0	101	8
5 µm	0,6	0,1	108	24
10 µM	0,5	0,1	96	23
20 µM	0,3	0,1	62	29
50 µM	0,1	0,0	24	13
100 µM	0,1	0,0	13	14

Anhang

Werte zu **Abbildung 30**

MTT (HEK-293) NPS2143-Test	MW	Stdabw	Ko = 100 %	StdAbw in %
Ko	0,9	0,1	100	8
100 nm	0,8	0,1	93	10
500 nm	0,8	0,1	98	10
1 µM	0,8	0,1	94	8
5 µm	0,8	0,1	98	7
10 µM	0,8	0,1	96	10
20 µM	0,4	0,1	49	22
50 µM	0,1	0,0	17	14
100 µM	0,1	0,0	10	28

MTT (HEK-293) Cinacalcet-Test	MW	Stdabw	Ko = 100 %	StdAbw in %
Ko	0,7	0,1	100	20
100 nm	0,7	0,0	105	7
500 nm	0,7	0,1	110	8
1 µM	0,6	0,1	98	11
5 µm	0,7	0,1	103	17
10 µM	0,6	0,1	99	12
20 µM	0,5	0,0	71	10
50 µM	0,4	0,0	55	12
100 µM	0,2	0,1	25	32

Werte zu **Abbildung 39**

p38alpha (T180/Y182)	MW	- Blank	HM =100 %	Erk1/2 (T202/Y204 - T185/Y187)	MW	- Blank	HM =100 %
pcDNA HM	218.106	146.823	100	pcDNA HM	410.680	339.397	100
pcDNA Ca ²⁺	234.571	163.288	111	pcDNA Ca ²⁺	502.073	430.790	127
pcDNA NPS + Ca ²⁺	191.354	120.072	82	pcDNA NPS + Ca ²⁺	435.804	364.522	107
pcDNA Cina + Ca ²⁺	201.466	130.183	89	pcDNA Cina + Ca ²⁺	477.800	406.518	120
CaSR1 HM	188.345	117.063	100	CaSR1 HM	730.846	659.563	100
CaSR1 Ca ²⁺	242.344	171.062	146	CaSR1 Ca ²⁺	1.218.185	1.146.902	174
CaSR1 NPS + Ca ²⁺	121.418	50.135	43	CaSR1 NPS + Ca ²⁺	537.969	466.686	71
CaSR1 Cina + Ca ²⁺	310.110	238.827	204	CaSR1 Cina + Ca ²⁺	895.769	824.487	125

Akt1/2/3 (T308)	MW	- Blank	HM =100 %	CREB (S133)	MW	- Blank	HM =100 %
pcDNA HM	198.828	127.545	100	pcDNA HM	476.360	405.077	100
pcDNA Ca ²⁺	191.202	119.919	94	pcDNA Ca ²⁺	578.357	507.074	125
pcDNA NPS + Ca ²⁺	177.929	106.646	84	pcDNA NPS + Ca ²⁺	518.637	447.354	110
pcDNA Cina + Ca ²⁺	187.484	116.202	91	pcDNA Cina + Ca ²⁺	515.530	444.248	110
CaSR1 HM	104.957	33.674	100	CaSR1 HM	740.676	669.394	100
CaSR1 Ca ²⁺	155.040	83.758	249	CaSR1 Ca ²⁺	1.076.957	1.005.675	150
CaSR1 NPS + Ca ²⁺	136.253	64.971	193	CaSR1 NPS + Ca ²⁺	552.665	481.383	72
CaSR1 Cina + Ca ²⁺	120.475	49.193	146	CaSR1 Cina + Ca ²⁺	1.654.733	1.583.451	237

Anhang

c-Jun (S63)	MW	- Blank	HM =100 %	JNK pan (T183/Y185 - T221/Y223)	MW	- Blank	HM =100 %
pcDNA HM	284.587	213.304	100	pcDNA HM	265.507	194.224	100
pcDNA Ca ²⁺	289.973	218.691	103	pcDNA Ca ²⁺	287.913	216.630	112
pcDNA NPS + Ca ²⁺	291.800	220.518	103	pcDNA NPS + Ca ²⁺	281.576	210.293	108
pcDNA Cina + Ca ²⁺	331.010	259.728	122	pcDNA Cina + Ca ²⁺	281.717	210.435	108
CaSR1 HM	275.036	203.753	100	CaSR1 HM	196.948	125.665	100
CaSR1 Ca ²⁺	498.994	427.711	210	CaSR1 Ca ²⁺	358.262	286.979	228
CaSR1 NPS + Ca ²⁺	250.453	179.170	88	CaSR1 NPS + Ca ²⁺	212.359	141.076	112
CaSR1 Cina + Ca ²⁺	678.049	606.766	298	CaSR1 Cina + Ca ²⁺	470.045	398.763	317

Anhang

Werte zu **Abbildung 40**, **Abbildung 42**, **Abbildung 43**, **Abbildung 45** und **Abbildung 47**

Western Blot (786-O)	Behandlung	ERK	<i>pERK1</i> (T202/Y204)/ <i>pERK2</i> (T185/Y187)	AKT	<i>pAKT</i> (S473)	<i>pSAP/JNK</i> (T183/Y185)	<i>pP90RSK</i> (S380)	<i>pPaxillin</i> (Y118)	<i>pSHC</i> (Y239/240)	<i>pSRC</i> (Y419)	<i>pCREB</i> (S133)
WT	HM	141	125	73	161	200	60	127	117	43	36
pcDNA3	HM	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Ca ²⁺	91	72	104	77	111	47	73	94	86	80
	NPS	82	89	105	86	109	88	73	92	79	60
	NPS + Ca ²⁺	82	83	118	136	132	81	80	77	83	109
	Cina + Ca ²⁺	73	90	111	142	139	66	99	101	81	97
CaSR1	HM	64	172	93	127	278	121	106	154	80	66
	Ca ²⁺	66	270	89	206	563	222	104	224	36	110
	NPS	74	91	86	89	129	50	39	85	77	69
	NPS + Ca ²⁺	83	159	76	125	203	97	86	50	93	69
	Cina + Ca ²⁺	85	247	65	193	538	233	133	139	34	107

Werte zu **Abbildung 41**, **Abbildung 44** und **Abbildung 46**

Western Blot (HEK-293)	Behandlung	ERK	<i>pERK1</i> (T202/Y204)/ <i>pERK2</i> (T185/Y187)	<i>pSAP/JN</i> K (T183/Y185)	<i>pPaxillin</i> (Y118)	<i>pSHC</i> (Y239/240)
WT	HM	124	67	204	94	126
pcDNA3	HM	100	100	100	100	100
	Ca ²⁺	98	95	73	104	52
	NPS + Ca ²⁺	37	140	nd	48	77
	Cina + Ca ²⁺	97	146	84	108	83
CaSR9	HM	148	386	177	195	109
	Ca ²⁺	149	2293	562	491	286
	NPS	107	309	170	137	86
	NPS + Ca ²⁺	112	219	215	134	84
	Cina + Ca ²⁺	112	2.120	715	462	355

8.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Tobias Haber
Hauberrisserstraße 36
65189 Wiesbaden

Promotion

2011 - 2015 Promotion im urologischen Forschungslabor der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg Universität Mainz - **Biologie** -

Studium

2006 - 2011 Diplom an der Johannes Gutenberg Universität Mainz im Studienfach - **Biologie** -

2002 - 2006 Vordiplom an der Philipps Universität-Marburg im Studienfach - **Biologie** -

Schulabschluss

2001 Abitur an der Taunusschule in Bad Camberg

8.6 Publikationen und Kongressbeiträge

8.6.1 Publikationen

1. Brenner W, Haber T, Junker K, Roos F, Thüroff JW: Knochenmetastasierung des Nierenzellkarzinoms – Die Bedeutung von Calcium und Calcium-sensitivem Rezeptor
Der Urologe 2015 54:839-843
2. Haber T, Jöckel E, Roos F, Junker K, Prawitt D, Hampel C, Thüroff JW, Brenner W: Bone metastasis in renal cell carcinoma is preprogrammed in the primary tumor and caused by AKT and integrin $\alpha 5$ signaling.
Submitted in J Urol. 2014
3. Jöckel E, Haber T, Prawitt D, Junker K, Hampel C, Thüroff JW, Roos FC, Brenner W: High calcium concentration in bones promotes bone metastasis in renal cell carcinomas expressing calcium-sensing receptor.
Molecular Cancer 13: 42, 2014

8.6.2 Kongressbeiträge

1. Ishibashi K, Kubo H, Kojima Y, Haber T, Thüroff JW, Brenner W: IL-6 receptor antibody enhances the effect of TKI against renal cell carcinoma.
AUA Annual Meeting, New Orleans, USA, 15.-19.05.2015 J Urol 193 (4S) e455–456
Posterpreis: „Best of Posters“
2. Haber T, Roos FC, Junker K, Prawitt D, Thüroff JW, Brenner W: Transfection of calcium-sensing receptor is responsible for metastatic behavior of renal carcinoma cells.
6. Symposium Urologische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie, 13.11. – 15.11.2014 in Homburg, Germany. (to be published in Der Urologe)
3. Brenner W, Jöckel E, Haber T, Roos FC, Prawitt D, Junker K, Hampel C, Thüroff JW: Bone metastases in renal cell carcinoma are promoted by calcium via calcium sensing receptor signalling.
8th International Conference of Anticancer Research, 06.-10.10.2014, Sithonia, Griechenland.
Anticancer Res. 34 (10): 5850, 2014
4. Ishibashi K, Kojima Y, Haber T, Hampel C, Roos FC, Thüroff JW, Brenner W: Prevention of tyrosine-kinase inhibitors (TKI) resistance in renal cell carcinoma (RCC) by IL-6 blockade.
66. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie, Düsseldorf 01.-04.10.2014. Der Urologe 53(S1): 12, 2014
5. Breuksch I, Haber T, Roos FC, Hampel C, Junker K, Thüroff JW, Brenner W: Protein kinase C epsilon is involved in the regulation of calcium-sensing receptor in renal cell carcinoma.
EMBO Meeting, Cellular Signaling & Cancer Therapy, Cavtat, Croatia, 23.05. – 27.05.2014.
Abstract P099, S.163
6. Haber T, Breuksch I, Hampel C, Roos FC, Thüroff JW, Brenner W: Low concentration of tyrosine kinase inhibitors induces tumor progression in renal cell carcinoma via Akt and SRC activity.
EMBO Meeting, Cellular Signaling & Cancer Therapy, Cavtat, Croatia, 23.05. – 27.05.2014.
Abstract P097, S. 161
7. Jöckel E, Haber T, Roos FC, Prawitt D, Junker K, Hampel C, Thüroff JW, Brenner W: Calcium promotes bone metastases in renal cell carcinoma via calcium sensing receptor signalling.

- EMBO Meeting, Cellular Signaling & Cancer Therapy, Cavtat, Croatia, 23.05. – 27.05.2014.
Abstract P027, S. 89
8. Ishibashi K, Kojima Y, Haber T, Thüroff JW, Brenner W: Tyrosine-kinase inhibitors treatment induces IL-6 secretion on renal carcinoma cells.
AUA Annual Meeting, New Orleans, USA, 16.-21.05.2014 J Urol 191 (4S) e373
 9. Schneider E, Haber T, Roos FC, Junker K, Hampel C, Thüroff JW, Brenner W: Bone metastasis in renal cell carcinoma are predicted by characteristics of the primary tumor.
AACR Annual Meeting 05.-09.04.2014 San Diego, USA. Published in: Proceedings of the 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2014 Apr 5-9; San Diego, CA. Philadelphia (PA): AACR; 2014. Abstract nr 37
 10. Schneider E, Haber T, Roos FC, Junker K, Hampel C, Thüroff JW, Brenner W: Bone metastasis in renal cell carcinoma is predicted by characteristics of the primary renal tumor.
18th World Congress on Advances in Oncology and 16th International Symposium on Molecular Medicine, Hersonissos, Griechenland 10.-12.10.2013. Int J Mol Med 32(S1), S7, 2013
 11. Haber T, Schneider E, Roos FC, Junker K, Hampel C, Thüroff JW, Brenner W: The formation of bone metastases is already determined in the primary tumor.
65. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie, Dresden 25.-28.09.2013. Der Urologe 52(S1): 22, 2013
 12. Schneider E, Haber T, Roos FC, Prawitt D, Junker K, Hampel C, Thüroff JW, Brenner W: Characteristics of the primary tumor predicts bone metastasis of renal cell carcinoma.
AUA Annual Meeting, San Diego, USA, 04.-08.05.2013. J Urol 189 (4 S): e252
 13. Schneider E, Haber T, Roos FC, Prawitt D, Junker K, Hampel C, Thüroff JW, Brenner W: Certain characteristics of the primary tumor promote bone metastasis of renal cell carcinoma.
4. Symposium Urologische Forschung der DGU, 08.-10.11.2012, Berlin. Der Urologe 52: 109, 2013
 14. Schneider E, Haber T, Prawitt D, Junker K, Roos FC, Hampel C, Thüroff JW, Brenner W: Calcium promotes bone metastasis in renal cell carcinoma.
64. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie, Leipzig 26.-29.09.2012. Der Urologe 51(S): 34, 2012
 15. Haber T, Schneider E, Khageh-Hosseini S, Blaheta R, Hampel C, Roos FC, Thüroff JW, **Brenner W**: Tumor progression during tyrosine kinase inhibitor treatment triggered by a low serum concentration.
AUA Annual Meeting, Atlanta, USA, 19.-23.05.2012. J Urol 187 (4 S): e124
 16. Haber T, Schneider E, Blaheta R, Hampel C, Roos F, Thüroff JW, Brenner W: Molekulare Grundlagen der Tumorprogression des Nierenzellkarzinoms unter Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren.
3. Symposium Urologische Forschung der DGU, 8.-10.11.2011, Jena, publiziert in Urologe A
 17. Haber T: Influence of Rottlerin, Sorafenib and Sunitinib in the migration of renal cancer cells.
9th International Congress of Young Medical Scientists, Poznań, Polen, 17.-19.05.2009

8.6.3 Danksagung

Eidesstattliche Erklärung

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

Wiesbaden, den 14. Juli 2015

Tobias Haber