

Einfluss der Osmolarität auf die Proliferation von Nierenzellkarzinom Zelllinien

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Carolin Walkemeyer

geboren am 01. Oktober 1992 in Braunschweig

Betreuer: PD Dr. rer. nat. Bayram Edemir

Gutachter:

apl. Prof. Dr. Martin S. Staeger

Prof. Dr. rer. nat. Giuliano Ciarimboli, Münster

07.06.2022

16.12.2022

Referat

Das Klarzellige Nierenzellkarzinom stellt mit 90% die häufigste maligne Entartung der Niere dar. Eine wichtige und in Nierenzellkarzinomen häufig anzufindende Mutation ist die des Von-Hippel-Lindau-Gens (VHL). In den letzten Jahren hat sich ein Wandel hinsichtlich des therapeutischen Ansatzes vollzogen, hin zu sogenannten Targeted Therapies, zu welcher auch der Tyrosinkinaseinhibitor Sunitinib gehört. Wichtig für die Funktionsweise der Niere ist eine zum Teil stark erhöhte Osmolarität innerhalb der Niere, die sich auf die Expression verschiedener Gene auswirkt, welche die Anpassung der Zelle an eine solche Stresssituation regulieren. Die Expression dieser Gene wird wiederum von einer Mutation im VHL-Gen beeinflusst. In dieser Arbeit werde ich den Einfluss der Osmolarität auf die Proliferation verschiedener Zelllinien des Nierenzellkarzinoms untersuchen, welche zugleich mit Sunitinib behandelt wurden. Dazu wurden Proliferationsassays, Colony Forming Assays und Zellzyklusanalysen verwendet. Es zeigte sich eine verminderte Proliferation wie auch eine verminderte Koloniebildung sowohl unter Sunitinib-Gabe, wie unter auch unter erhöhter Osmolarität. Ein zusätzlicher Effekt bei einer kombinierten Gabe von Sunitinib und hoher Osmolarität konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Im Rahmen der Zellzyklusanalyse schien lediglich Sunitinib eine Auswirkung hinsichtlich eines Zellarrests zu haben, die Osmolarität hatte hierauf keinen Einfluss. Auch die Hinzunahme eines Histon-Deacetylase-Hemmers zur Sunitinib-Therapie zeigte unter verschiedenen Osmolaritäten keinen zusätzlichen Nutzen. Daraus lässt sich schließen, dass auch Zellen des Nierenzellkarzinoms mit zum Teil vorhandenen Mutationen auf eine erhöhte Osmolarität reagieren, aber ein additiver Nutzen hinsichtlich einer zusätzlichen Gabe zu dem Tyrosinkinaseinhibitor Sunitinib nicht besteht.

Walkemeyer, Carolin: Einfluss der Osmolarität auf die Proliferation von Nierenzellkarzinom Zelllinien, Halle (Saale), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Klinik für Innere Medizin IV - Hämatologie und Onkologie, Dissertation, 63 Seiten, Erscheinungsjahr: 2022

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	- 1 -
1.1 Die menschliche Niere und ihre Funktion.....	- 1 -
1.2 Molekulare Mechanismen in der Krebsentstehung.....	- 3 -
1.3 Der Einfluss des VHL-Gens auf das Nierenzellkarzinom.....	- 4 -
1.4 Die Wirkung von Tyrosinkinaseinhibitoren beim Nierenzellkarzinom.....	- 7 -
1.5 Der Einfluss von VHL und Osmolarität auf die Expression von Genen	- 8 -
1.6 Der Zellzyklus und seine Rolle beim Nierenzellkarzinom.....	- 10 -
2. Zielstellung	- 12 -
3. Materialien und Methoden.....	- 13 -
3.1 Materialien.....	- 13 -
3.1.1 Geräte.....	- 13 -
3.1.2 Chemikalien und Lösungen	- 14 -
3.1.3 Puffer.....	- 15 -
3.1.4 Nährmedien	- 15 -
3.1.5 Zelllinien	- 16 -
3.1.6 Kits.....	- 16 -
3.2 Methoden	- 17 -
3.2.1 Zellbiologische Methoden.....	- 17 -
3.2.2 Zellkulturbedingungen	- 17 -
3.2.3 Zellsubkultivierung.....	- 17 -
3.2.4 Zellzahlbestimmung	- 17 -
3.2.5 Erhöhung der Osmolarität	- 17 -
3.2.6 Colony Forming Assay	- 18 -

3.2.7 Proliferationsassay	- 19 -
3.2.8 Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie	- 19 -
4. Ergebnisse	- 21 -
4.1 Einfluss von Sunitinib und Osmolarität auf die Proliferation.....	- 21 -
4.2 Einfluss von Sunitinib und Osmolarität auf die tumorbildenden Eigenschaften	- 28 -
4.3 Einfluss von Sunitinib und Osmolarität auf den Zellzyklus	- 38 -
4.4 Einfluss von Sunitinib und TSA auf die Proliferation	- 46 -
5. Diskussion.....	- 50 -
5.1 Einfluss von Osmolarität und Sunitinib auf die Proliferation.....	- 50 -
5.2 Einfluss von Sunitinib und Osmolarität auf die tumorbildenden Eigenschaften	- 52 -
5.3 Einfluss von Sunitinib und Osmolarität auf den Zellzyklus	- 53 -
5.4 Einfluss von Sunitinib und TSA auf die Proliferation	- 54 -
6. Zusammenfassung	- 56 -
Literaturverzeichnis	- 57 -
Thesen.....	- 63 -

Selbstständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche

Danksagung

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung der Harnkonzentrierung in der Niere

Abb. 2: Funktionsweise von pVHL

Abb. 3: Wirkeffekte von Sunitinib

Abb. 4: Zellzyklus

Abb. 5: Einfluss von Sunitinib und Inkubationsdauer auf die Proliferation von Caki-1 und Caki-2

Abb. 6: Einfluss von Sunitinib und Inkubationsdauer auf die Proliferation von 786-0 und

786-0-VHL

Abb. 7: Einfluss der Osmolarität auf die Proliferation der unbehandelten Kontrollen von 786-0,

786-0-VHL, Caki-1 und Caki-2

Abb. 8: Einfluss von Sunitinib und Osmolarität auf die Proliferation der Caki-1 und Caki-2

Abb. 9: Einfluss von Sunitinib und Osmolarität auf die Proliferation der 786-0 und 786-0-VHL

Abb. 10: Wachstumsrate der Proliferationsassays

Abb. 11: Ausschnitt eines Soft Agar Assays mit Caki-1 und Caki-2 in 300 mOsmol/l Medium

und 600 mOsmol/l Medium nach 14 Tagen Inkubationszeit

Abb. 12: Ausschnitt eines Soft Agar Assays mit VHL- und VHL+ in 300 mOsmol/l Medium und

600 mOsmol/l Medium nach 14 Tagen Inkubationszeit

Abb. 13: Einfluss der Osmolarität auf die Koloniezahl bei 786-0, 786-0-VHL, Caki-1 und Caki-2

Abb. 14: Einfluss der Osmolarität auf die Koloniegröße bei 786-0, 786-0-VHL, Caki-1 und Caki-2

Abb. 15: Einfluss von Sunitinib auf die Koloniezahl bei 786-0, 786-0-VHL, Caki-1 und Caki-2 bei

300mOsmol/l

Abb. 16: Einfluss von Sunitinib auf die Koloniegröße bei 786-0, 786-0-VHL, Caki-1 und Caki-2

bei 300mOsmol/l

Abb. 17: Einfluss von Osmolarität und Sunitinib auf die Koloniezahl bei Caki-1 und Caki-2

Abb. 18: Einfluss von Osmolarität und Sunitinib auf die Koloniezahl bei 786-0- und 786-0-VHL

Abb. 19: Einfluss von Osmolarität und Sunitinib auf die Koloniegröße bei 786-0, 786-0-VHL,
Caki-1 und Caki-2

Abb. 20: Wachstumsrate der Colony Forming Assays

Abb. 21: Durchflusszytometrie zur Zellzyklusanalyse

Abb. 22: Einfluss von Osmolarität und Sunitinib auf den Zellzyklus bei 786-0 und 786-0-VHL
G0/1 Phase

Abb. 23: Einfluss von Osmolarität und Sunitinib auf den Zellzyklus bei 786-0 und 786-0-VHL
G2/M Phase

Abb. 24: Einfluss von Osmolarität und Sunitinib auf den Zellzyklus bei Caki-1 und Caki-2
G0/1 Phase

Abb. 25: Einfluss von Osmolarität und Sunitinib auf den Zellzyklus bei Caki-1 und Caki-2
G2/M Phase

Abb. 26: Einfluss von Osmolarität und Sunitinib auf den Zellzyklus bei 786-0 und 786-0-VHL
S Phase

Abb. 27: Einfluss von Osmolarität und Sunitinib auf den Zellzyklus bei Caki-1 und Caki-2 S Phase

Abb. 28: Einfluss von Osmolarität und Sunitinib auf den Zellzyklus bei 786-0 und 786-0-VHL
Sub G1 Phase

Abb. 29: Einfluss von Osmolarität und Sunitinib auf den Zellzyklus bei Caki-1 und Caki-2
Sub G1Phase

Abb. 30: Einfluss von TSA allein und TSA/Sunitinib auf die Proliferation bei Caki-1 und Caki-2

Abb. 31: Einfluss von TSA allein und TSA/Sunitinib auf die Proliferation bei 786-0 und

786-0-VHL

Abb. 32: Einfluss von Sunitinib allein und TSA/Sunitinib auf die Proliferation bei Caki-1 und

Caki-2

Abb. 33: Einfluss von Sunitinib allein und TSA/Sunitinib auf die Proliferation bei 786-0 und

786-0-VHL

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: 50x TAE-Puffer

Tabelle 2: Verwendete Nähmedien

Tabelle 3: Verwendete Zelllinien

Tabelle 4: Verwendete Kits

Abkürzungsverzeichnis

ACHN	Human Kidney Adenocarcinoma Zelllinie
ADH	Adiueritsches Hormon
Aqp2	Aquaporin-2
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderalbumin)
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGR-1	Early growth response protein 1
ELF5	Ets Domänen Transkriptionsfaktor E74-like factor 5
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FKS	Fetales Kälberserum
HIF- α	Hypoxie-induzierbarer-Faktor α
M-Phase	Mitosephase

mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MTS	3-(4,5-dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-Tetrazolium
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NADH	Nicotinamidadeninukleotid
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
Nfat5	Nuclear factor of activated T cells 5
NF- κB	Nukleären-Faktor- κB
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF β	Platelet-Derived Growth Factor β
PI	Propidiumiodid
RNA	Ribonukleinsäure
S-Phase	Synthesephase
TAE	TRIS-Acetat-EDTA TGF α Transforming Growth Factor α
TonEBP	Tonicity Enhancer Binding Protein
TSA	Histondeacetylase Trichostatin A
TSG2-Gen	Tuberosklerosegen-2
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	Von-Hippel-Lindau
WT	Wildtyp, nicht mutiert

1. Einleitung

1.1 Die menschliche Niere und ihre Funktion

Als paarig angelegtes Organ im Retroperitonealraum erfüllt die Niere verschiedene Aufgaben. Sie filtert pro Minute ca. 120 ml Blutplasma und dient somit der Elimination harnpflichtiger Substanzen. Zudem spielt sie eine wichtige Rolle für den Wasser- und Elektrolythaushalt des Körpers, genauso wie für die Regulation des Säure-Base-Gleichgewichts und der Regelung des osmotischen Drucks. Des Weiteren werden Renin und Erythropoetin in ihren Zellen gebildet, beide Hormone sind wichtig für die Regulation des Blutdrucks und die Blutbildung. Auch an der Synthese von Calcitriol, dem doppelt hydroxylierten Vitamin D₃, ist die Niere entscheidend beteiligt. Dieses Hormon ist wichtig für den Kalziumstoffwechsel des Körpers (Friedrich, 2007).

Der Prozess der Harnbildung erfolgt über mehrere Schritte, in denen das Blut gefiltert und schließlich Wasser und andere Stoffe rückresorbiert werden, was zu einer Konzentration des Harns führt. Zunächst entsteht der Primärharn, indem das zufließende Blut in den Nierenkörperchen, den Glomeruli, nahe der Nierenrinde ultrafiltriert wird (siehe Abb. 1). Der entstandene Primärharn (ca. 180 l/Tag) wird vom Kapselraum aufgefangen und in ein Tubulussystem abgegeben, das sich über Nierenrinde, äußeres und inneres Mark der Niere erstreckt. In den Tubuli werden über diverse Transportvorgänge zirka 99% des Wassers und der gelösten Teilchen rückresorbiert, sodass pro Tag abhängig von Geschlecht und Alter zwischen 500 und 2000 ml konzentrierter Endharn entsteht (Behrends, 2017).

Für die Konzentration des Harns spielt das in Abbildung 1 gezeigte, sogenannte Gegenstromprinzip eine zentrale Rolle. Bereits im proximalen Tubulus wird ein Großteil des Primärharns rückresorbiert. Der folgende Abschnitt, die sogenannte Henle-Schleife besitzt einen absteigenden und einen aufsteigenden Teil, welche gegenläufig angeordnet sind. Hier wird ein osmotischer Gradient zwischen Rinde und Mark aufgebaut. Im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife wird über Na⁺/K⁺/2Cl⁻-Transporter aktiv Natrium resorbiert, welchem Chlorid passiv folgt. Wasser hingegen verbleibt im Tubulus, da die Membran in diesem Teil wasserundurchlässig ist. Dadurch wird das Niereninterstitium, das Gewebe zwischen den Tubulussystemen, hyperosmolar. In der Folge entsteht zwischen absteigendem Teil der Henle-Schleife und Interstitium ein Osmolaritätsgradient. Wasser kann durch die im absteigenden Teil permeable Membran aus dem Tubulus in das Interstitium diffundieren. Das wiederum führt +dazu, dass der Harn, der anschließend im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife ankommt, stark hyperosmolar ist. Ihm kann also nun vergleichsweise leicht Natriumchlorid entzogen werden – der Kreislauf beginnt erneut. Im darauffolgenden distalen Nephron, dem Sammelrohr, findet

eine hormonell gesteuerte Feinabstimmung der Harnzusammensetzung statt. Aldosteron beispielsweise steuert den Elektrolyt-Transport, ADH (Adiuretisches Hormon) den Einbau von Aquaporinen, über welche Wasser resorbiert werden kann (Pape, 2010).

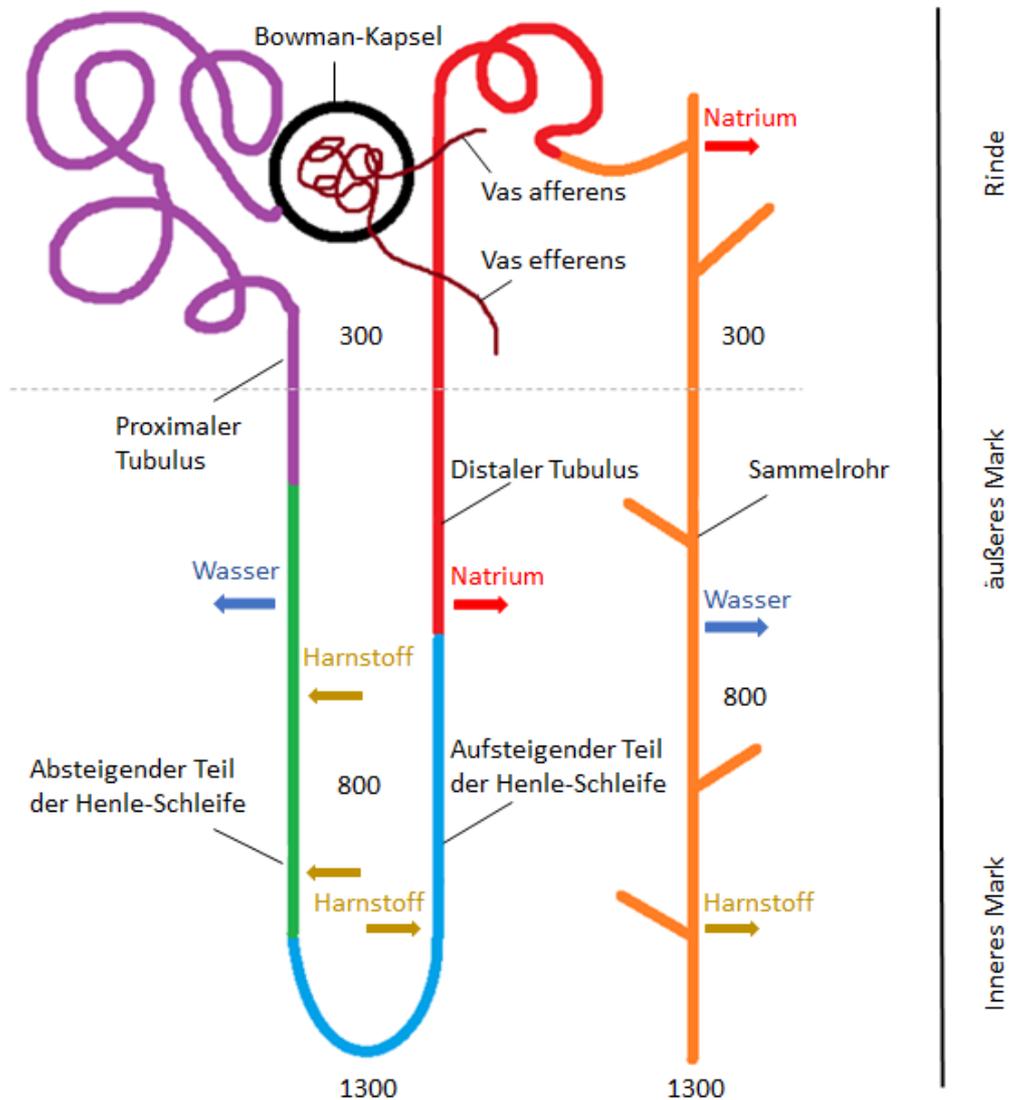


Abb. 1: Darstellung der Harnkonzentrierung in der Niere. Links dargestellt ist die Anatomie des Tubulussystems. Rechts sieht man das Prinzip der Harnkonzentrierung mittels des Gegenstromprinzips. Durch parallel verlaufende Strukturen wird im Interstitium die Entstehung eines kortikomedullären Osmolaritätsgradienten erreicht. Grün dargestellt sind die harnableitenden Strukturen, also Sammelrohr, Henle-Schleife, etc. Rot der arterielle, blau der venöse Blutfluss. Die Pfeile zeigen die Flussrichtung von Blut/Urin, bzw. den gerichteten Transport an (vernändert nach Schmidt, 2001).

Eine weitere, für die Hyperosmolarität des Nierenmarks verantwortliche Substanz ist Harnstoff, der durch eine Resorption im Sammelrohr im Mark der Niere akkumuliert und dem absteigenden Teil der Henle-Schleife Wasser entzieht, bis er im aufsteigenden Teil wieder in das

Tubuluslumen eintreten kann und somit wieder für den Kreislauf zur Verfügung steht (Friedrich, 2007). Die Osmolarität des Niereninterstitiums nimmt im Verlauf von der Nierenrinde bis hin zur Papillenspitze von 290 mosmol/L bis maximal 1300 mosmol/L zu, bezeichnet wird dies als sogenannter corticomedullärer Osmolaritätsgradient (Pape, 2010).

Die Physiologie der Niere stellt sich also als ein hochkomplexes System dar, das von vielerlei Faktoren beeinflussbar und abhängig ist. Das Gleichgewicht dieses Systems kann auf unterschiedliche Arten gestört werden. Derartig störende Auswirkungen, nicht nur auf das Organ Niere an sich, sondern auf den gesamten Organismus kann dabei eine Tumorerkrankung haben.

1.2 Molekulare Mechanismen in der Krebsentstehung

In einem gesunden Organismus liegt zwischen der Neubildung von Zellen (Zellproliferation) und dem programmierten Zelltod (Apoptose) ein artgerechtes Gleichgewicht vor, eine Homöostase. Bei der Krebsentstehung ist dieses Gleichgewicht zugunsten der Zellvermehrung verschoben, was ein unkontrolliertes, invasives Wachstum von Zellen zur Folge hat. Hemmende Signale werden nicht erkannt - beziehungsweise ausgeführt - oder Wachstum anregende Signale verstärkt (Diori Karidio & Sanlier, 2021). Dies basiert entweder auf einer germinalen Mutation, bei der diese bereits in der Zygote vorhanden ist, sodass später alle Zellen des Organismus von der Mutation betroffen sind, oder auf einer somatischen Mutation im genetischen Code, bei der nur eine einzelne Zelle geschädigt wurde (Buentig, Storkel, & Atzpodien, 2002). Yu et al. beschreiben in ihrer Arbeit, dass besagte Veränderungen von sogenannten Tumorstammzellen ausgehen, die über verschiedene Eigenschaften verfügen und bis zu 25% der soliden Tumormasse ausmachen können. So haben sie wie herkömmliche Stammzellen die Fähigkeit der Selbsterneuerung, das heißt, dass nach einer Zellteilung immer wieder eine neue Stammzelle entsteht. Zudem haben sie ein sehr hohes Differenzierungspotential, das beschreibt die Fähigkeit der Differenzierung in verschiedene Gewebearten, die man von embryonalen Stammzellen kennt. Aus diesen Tumorstammzellen entstehen stark proliferierende Krebsvorläuferzellen, die die Masse des Tumors bilden, sich aber nur begrenzt selbst erneuern können. Man vermutet, dass sich Krebsstammzellen aus gesunden Stammzellen, die durch genetische oder epigenetische Veränderungen entarteten oder aber aus Progenitorzellen entwickelt haben könnten. Dabei handelt es sich um die Vorläufer somatischer Zellen, die eigentlich die Eigenschaft der Selbsterneuerung verloren haben. Um diese wiederzuerlangen sind bei der Entstehung von Krebsstammzellen wiederum Mutationen notwendig (Yu et al., 2012)

Allgemein werden verschiedene genetische Alterationen beschrieben, die zu einer Tumorentstehung führen können. Am Ende dieser Mutationen steht entweder ein zu hoher Wachstumsimpuls, gestörte DNA-Reparatur-Mechanismen oder eine verminderte Inhibition von Wachstum (Diori Karidio & Sanlier, 2021).

Zum Beispiel ist dies die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von Genen, die eine hemmende Wirkung auf die Zellproliferation haben. Es gibt verschiedene Mechanismen, die einen solchen Effekt erzielen. Beispielsweise Genmutationen wie Deletionen, aber auch Hypermethylierung oder ein Verlust der Heterozygotie (Diori Karidio & Sanlier, 2021).

Des Weiteren trägt die Aktivierung von Onkogenen zur Krebsentstehung bei. Als Onkogen bezeichnet man die mutierte Form von Protoonkogenen, die für die regelrechte Zellteilung- / und -differenzierung eine wichtige Rolle spielen (Hesketh, 1995). Sie kodieren für Wachstumsfaktoren, transmembranöse Wachstumsrezeptoren, Signaltransduktionsfaktoren oder nukleäre Transkriptionsfaktoren (Buentig et al., 2002). Genetische Veränderungen von Protoonkogenen können zur Aktivierung von Onkogenen führen, es handelt sich um eine sogenannte „gain of function“ Mutation. Die Folge ist eine gestörte Zellteilung mit erhöhter Proliferationsrate (Ganten, 1998).

Für die Entstehung des im Folgenden thematisierten Nierenzellkarzinoms spielt ein Tumorsuppressor, das von-Hippel-Lindau-Gen (VHL-Gen), eine wichtige Rolle (Buentig et al., 2002).

1.3 Der Einfluss des VHL-Gens auf das Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom ist mit etwa 90% aller nieren-eigenen Karzinome der häufigste maligne Tumor der Niere, dessen Ursprung das Epithel von Tubuluszellen darstellt (Roth, 2011). Diese Erkrankung stellt zirka 3% aller im Erwachsenenalter vorkommenden bösartigen Tumoren dar, wobei Männer häufiger erkranken als Frauen. Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr (Buentig et al., 2002).

Nierenzellkarzinome lassen sich nach verschiedenen Klassifikationen anhand histologischer oder auch genetischer Veränderungen in verschiedene Subtypen einteilen, von denen das klarzellige Nierenzellkarzinom neben beispielsweise dem papillären, chromophoben oder Sammelrohrkarzinom mit etwa 70-80% der häufigste ist. Seinen Ursprung hat das klarzellige Nierenzellkarzinom in proximalen Tubulusepithelzellen (Buentig et al., 2002).

Zu tumorbegünstigenden Risikofaktoren zählen zum Beispiel Nikotinabusus, Adipositas, terminale Niereninsuffizienz, sowie kanzerogene Umweltgifte wie Trichlorethen, Cadmium oder Blei. Ein besonders hohes Risiko an einem Nierenzellkarzinom zu erkranken besteht bei

Patienten mit einer hereditären Prädisposition, wie sie zum Beispiel bei der tuberösen Sklerose oder dem Von-Hippel-Lindau-Syndrom vorliegt (Buentig et al., 2002). Trotz der großen Mehrheit der sporadisch auftretenden Fälle weist ein Großteil (über 70%) der klarzelligen Nierenzellkarzinome eine ähnliche genetische Veränderung auf wie sie beim Von-Hippel-Lindau-Syndrom vorliegt (Moch, 2008). Bei diesem Syndrom zeigt sich eine Deletion auf Chromosom 3q und auch bei sporadischen Nierenzellkarzinomen findet sich im Bereich dieses sogenannten VHL-Gens oft eine Deletion, Mutation oder Hypermethylierung (eine Veränderung, die durch eine Methylierung von Cytosin in der Promotorregion eines Gens zu einem epigenetischen Silencing des betroffenen Genabschnittes führt) (Moch, 2008).

Besagtes VHL-Gen kodiert für das VHL-Protein, welches verschiedene Aufgaben erfüllt (Kaelin, 2017).

Zum einen spielt pVHL eine wichtige Rolle bei der Anpassungsfähigkeit der Zelle an hypoxische Zustände. Wichtig ist hier der Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierbarer-Faktor (HIF), welcher verschiedene Untereinheiten – α und β – besitzt. Es gibt drei verschiedene Untergruppen, HIF1 α , HIF2 α und HIF3 α . Für die Entstehung des Nierenzellkarzinoms spielt HIF1 α , insbesondere aber auch HIF2 α eine große Rolle (im weiteren Text nur noch als HIF α bezeichnet) (Kaelin, 2017). Unter hypoxischen Zuständen transloziert HIF α in den Zellkern und bildet einen Komplex mit HIF β und HRE (HRE = Hormone Responsive Element, Bindungsstelle der DNA für nukleäre Hormonrezeptoren). Dadurch wird die Expression von 100 bis 200 Genen reguliert (Kaelin, 2017), die Auswirkungen auf den zellulären Metabolismus (Tello et al., 2011), Angiogenese (Liu, Cox, Morita, & Kourembanas, 1995), Invasion, Erythropoese (Semenza, Neufelt, Chi, & Antonarakis, 1991) und Metastasierung haben.

Liegt kein Sauerstoffmangel vor, kommt es zu einer Hydroxylierung von HIF α im Plasma, wodurch eine Bindungsstelle für pVHL entsteht. Mithilfe eines sogenannten VCB-Cul2-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes (VCB = ein Subkomplex der Ubiquitin Ligase; Cul2 = zur Gruppe der Culline gehörend, einer Familie von Ubiquitin-Ligasen; E3 = Ubiquitin-ligierendes Enzym) kommt es im Folgenden zur Ubiquitinierung und proteolytischen Degradation von HIF α (siehe Abbildung 2) (Cockman et al., 2000).

Ein Fehlen der pVHL-Funktion imitiert somit einen Sauerstoffmangel. Es kommt zu einem dauerhafterhöhten Vorliegen von HIF α und einer Expressions von Genen, die eine wichtige Rolle bei der Onkogenese spielen. So zeigten sich bei erhöhter HIF α Aktivität eine vermehrte Expression von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Platelet-Derived Growth Factor β (PDGF β) oder Transforming Growth Factor α (TGF- α) (Brugarolas, 2007). Außerdem bewirkt eine verminderte Regulation von HIF α eine verminderte Expression von E-Cadherin, die zu den Zelladhäsionsproteinen zählen und eine wichtige Rolle für die Zell-Zell-Adhäsion und

Gewebedifferenzierung spielen. Dadurch kommt es zur Induktion der sogenannten Epithelial-Mesenchymalen Transition, dem Übergang von epithelialen Zellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften, welches ein typisches Verhalten von Nierenzellkarzinomzellen darstellt (Kaelin, 2017).

Des Weiteren reguliert pVHL die Aktivität des Nukleären-Faktors- κB (NF- κB). In vielen mutierten klarzelligen Nierenzellkarzinomen liegt eine erhöhte Aktivität von NF- κB vor, wodurch unter anderem die Resistenz gegen Apoptose begünstigt wird. Außerdem fördert das pVHL die proteolytische Degradierung von p53, einem wichtigen Tumorsuppressor. Eine weitere Rolle spielt pVHL in der Stabilisation der extrazellulären Matrix und des Mikrotubulus-assoziierten Zytoskeletts, wo ein Fehlen des Proteins zu Defekten in der Bildung von Kollagen-4- und Fibronectin-extrazellulärer-Matrix und somit zu einer erleichterten Angiogenese und Invasion führt. Schließlich dient das VHL-Protein der Aufrechterhaltung der Struktur der Primärzilie, welche eine zelluläre sensorische Organelle darstellt, die eine unkontrollierte Zellproliferation und Zystenbildung verhindert (Moch, 2008).

Inaktivierende Mutationen oder Hypermethylierungen des VHL-Gens und ein infolgedessen erniedrigter pVHL-Spiegel führen also zu multiplen Reaktionen in der Zelle, die eine Entartung fördern oder auslösen können.

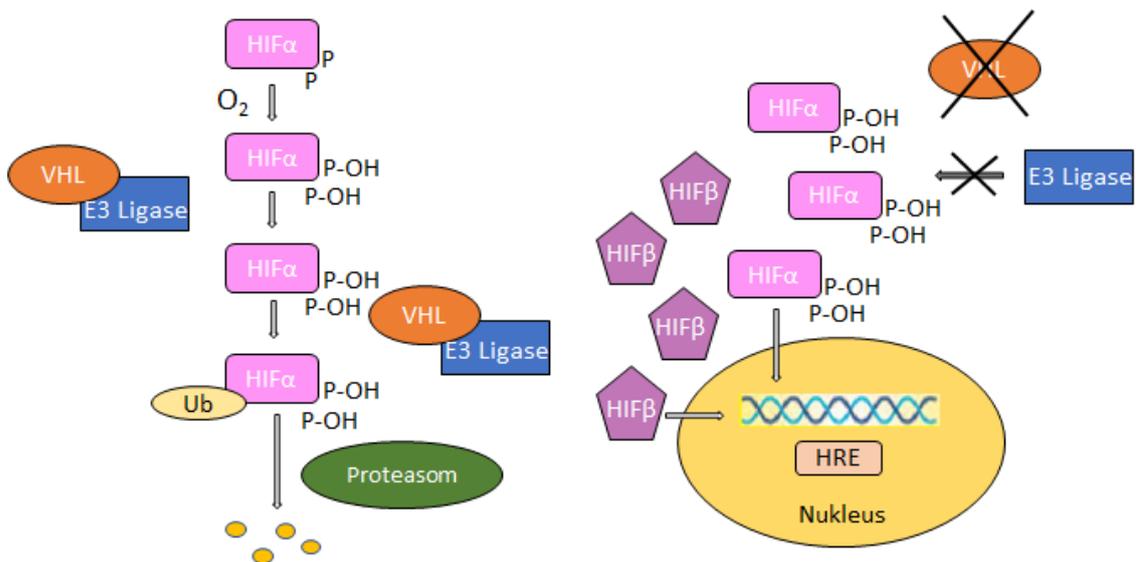


Abb. 2: Funktionsweise von pVHL. Unter Sauerstoffeinfluss (linke Seite) kommt es zur Hydroxylierung von HIF α , es entsteht eine Bindungsstelle für den VCB-Cul2-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes (in der Graphik als vereinfacht dargestellt als VHL-E3 Ligase). Dieser inaktiviert HIF α durch Ubiquitinierung (Ub), es kommt zur Proteolyse. Ein Fehlen von pVHL (rechte Seite) führt zu einem vermehrten Vorliegen von HIF α . HIF α bildet im Zellkern einen Komplex mit HIF β und HRE, dies führt zu einer erhöhten Expression von proliferationsfördernden Faktoren. (HRE = Hormone Responsive Element, Bindungsstelle der DNA für nukleäre Hormonrezeptoren) (verändert nach Clark, 2009).

1.4 Die Wirkung von Tyrosinkinaseinhibitoren beim Nierenzellkarzinom

Bei der chemotherapeutischen Therapie des Nierenzellkarzinoms spielen verschiedene Medikamente eine Rolle. Gerade bei metastasierten Karzinomen versagen klassische Zytostatika oft, weshalb die sogenannte gezielte Krebstherapie (Targeted Therapy) zum Einsatz kommt (Motzer, Escudier, Gannon, & Figlin, 2017). Diese macht sich spezielle biologische oder zytologische Eigenarten von Krebszellen zunutze, um diese gezielt anzugreifen und gesundes Gewebe zu schonen. Die ersten sogenannten Targeted Therapies bestanden aus einer Zytokin-basierten Therapie mit Interferon- α und/oder Interleukin-2. Allerdings sprachen nur wenige Patienten mit Nierenzellkarzinom (ca. 15%) auf diese Therapie an. Hinzu kam eine Vielzahl an unerwünschten Nebenwirkungen (Motzer et al., 2017).

Erst der Einsatz von neuartigen Medikamenten wie Sorafenib oder Sunitinib, sogenannten Tyrosinkinaseinhibitoren, zeigte eine deutliche Abnahme der Tumorwachstumsrate, korrelierend mit einer Verbesserung der mittleren Gesamtüberlebenszeit, die sich im Vergleich zur Interferontherapie verdoppelte (Motzer et al., 2017). Bei dieser Medikamentengruppe handelt es sich um aromatische Kohlenwasserstoffmoleküle, die mit ATP um die ATP-Bindungsstelle an Tyrosinkinasen konkurrieren und somit die Aktivierung der Rezeptoren unterbinden. Diese wiederum sind verschiedene Enzyme aus der Familie der Proteinkinasen, die als Rezeptoren reversibel eine Phosphatgruppe auf die Hydroxygruppe der Aminosäure Tyrosin eines Targetproteins übertragen und dadurch aktiviert werden. Diesen Vorgang nennt man Hydroxylierung (Bianchi et al., 2013). Tyrosinkinasen sind wichtig für die Signaltransduktion innerhalb der Zelle. Sie fungieren als Initiator oder Hemmer vieler Zellprozesse wie zum Beispiel Proliferation, Apoptose, Angiogenese oder Metastasenbildung (Drake, Lee, & Witte, 2014).

Sunitinib hemmt verschiedene Arten von Tyrosinkinasen: FLT3 (fetal liver tyrosine kinase 3)-Rezeptor, KIT (stem-cell growth factor)-Rezeptor, CSF-1 (koloniestimulierender Faktor)-Rezeptor, RET (rearranged during transfection)-Rezeptor, sowie die oben beschriebenen VEGF-Rezeptor (VEGF-1, -2, -3) und PDGF-Rezeptor (PDGF- α , - β) (S. Faivre et al., 2006). Letztere liegen bei einem Defekt des VHL-Gens in erhöhten Konzentrationen in den Zellen von Nierenzellkarzinomen vor (Kaelin, 2017). Die Hauptwirkung von Sunitinib bei Konzentrationen, die zur oralen Einnahme des Medikaments geeignet sind (ca. 0.12–0.25 μ M), ist eine Verminderung der Angiogenese, also der Neubildung von Blutgefäßen, mit denen sich der Tumor versorgt (Gentile, Piva, & Diaz, 2011). Die Angiogenese ist essentiell für das Tumorwachstum, zudem kann eine Metastasierung über das Blutsystem erfolgen. VEGFs und PDGFs sind wichtige pro-angiogenetische Faktoren, deren Wirkung durch Tyrosinkinaseinhibitoren wie Sunitinib blockiert werden können. In Vivo ist die Dichte der Blutkapillaren und die Neoangiogenese durch Sunitinib vermindert (Sandrine Faivre, Demetri, Sargent, & Raymond, 2007).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression von VEGF-Rezeptoren unter anderem auch von der Osmolarität abhängig ist. Eine Reaktion auf eine solche Stresssituation ist eine Hochregulierung des Rezeptors (Gentile et al., 2011).

In Vitro zeigte sich bei einer Konzentration von über 5 μM auch ein direkter Effekt auf die Tumorzellen durch eine Aktivierung der Apoptose, des geordneten Zelltods (Lahti et al., 2017).

Sunitinib findet bei fortgeschrittenen und/oder metastasierten Nierenzellkarzinomen, aber auch gastrointestinalen Stromatumoren und pankreatischen neuroendokrinen Tumoren Anwendung. Allerdings zeigen sich auch bei Sunitinib in der klinischen Anwendung zahlreiche, teils letal endende Nebenwirkungen, wie beispielsweise eine gestörte Wundheilung, Blutbildveränderungen und damit einhergehende Infektanfälligkeit, Anämie und Blutungen oder Schilddrüsenunterfunktionen (Gelbe Liste: Sunitinib – Anwendung, Wirkung, Nebenwirkungen). Des Weiteren zeigten monoklonale Antikörper wie Ipilimumab (ein cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 - CTLA-4 - Immun-Checkpoint-Inhibitor, welcher inhibitorische Signale auf T-Zellen blockiert. In der Folge findet eine Erhöhung der T-Zell-vermittelten Anti-Tumor-Immunantwort statt) oder Nivolumab (der Antikörper bindet an den Programmed Death-1-Rezeptor - PD-1 - und inhibiert die Hemmung der T-Zellimmunantwort) einen signifikanten Vorteil im Ansprechen, progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben gegenüber Sunitinib bei Patienten mit intermediärem und hohem Risiko. Sunitinib findet hauptsächlich bei Patienten mit niedrigem Risiko oder als Zweitlinientherapie Anwendung ("Kurzversion S3-Leitlinie Nierenzellkarzinom," August 2020).

Ein großes Problem stellt zudem die hohe Entwicklung von Resistenzen gegen Sunitinib dar. Fast alle Patienten entwickeln diese im Laufe von zirka 12 Monaten, einige sind von Anfang an resistent (Kamli, Glenda, Li, Vesey, & Morais, 2018).

1.5 Der Einfluss von VHL und Osmolarität auf die Expression von Genen

Wie bereits beschrieben herrschen im Niereninterstitium teilweise extrem hohe Osmolaritäten von bis zu 1300 mOsmol/l verglichen zu den 300 mOsmol/l des Blutplasmas (Pape, 2010). Diese stellen für die dortigen Zellen einen Stressfaktor dar. Ein akuter Anstieg der Osmolarität führt zum Beispiel zu einem Absinken des Zellvolumens durch Flüssigkeitsverlust. Die Transkription und Translation werden gestoppt, der Zellzyklus kommt zum Erliegen und es treten DNA-Strangbrüche auf (M. B. Burg, Ferraris, & Dmitrieva, 2007). Die Zelle hat verschiedene Mechanismen entwickelt, um sich an die erhöhte Osmolarität anzupassen. Dies tut sie unter anderem durch die Expression von sogenannten osmoprotektiven Genen. Dabei handelt es sich beispielsweise um Transkriptionsfaktoren wie Egr-1 und c-fos oder tonicity enhancer binding

Protein (TonEBP auch bekannt als nuclear factor of activated t-cells, NFAT5). Diese werden bei hohen Osmolaritäten vermehrt exprimiert und stabilisieren in Folge den osmotischen Druck in der Zelle (M. B. Burg, Kwon, E. D., & Kültz, D., 1996). Dieser Mechanismus ist allerdings bei Patienten mit Nierenzellkarzinom gestört.

Dies zeigt sich beispielsweise am Ets Domänen Transkriptionsfaktor E74-like factor 5 (kurz ELF5). ELF5 stellt einen wichtigen Tumorsuppressor dar, der bei der Entstehung des Nierenzellkarzinoms eine Rolle spielt und gehört zur Familie der Ets Transkriptionsfaktoren. Die Aufgabe der Ets Transkriptionsfaktoren ist die Kontrolle der Zellproliferation (Seth & Watson, 2005). Im Vergleich zu normalen Nierenzellen ist der ELF5 Tumorsuppressor bei vielen Nierenkarzinomen deutlich herunterreguliert, was eine erhöhte Zellproliferation begünstigt (Lapinskas et al., 2011). In vorangegangenen Studien konnte eine deutliche Abhängigkeit der Expression von ELF5 durch die Osmolarität gezeigt werden. Unter hyperosmolaren Bedingungen und damit verbundenem Stress für die Nierenzellkarzinomzellen wurde die Expression induziert (Kandabarau et al., 2019). Weitere Studien ergaben, dass der Einfluss der Osmolarität auf die Expression von Genen in der Niere auch von der Expression des VHL Gens beeinflusst wird (Groß, Chernyakov, Gallwitz, Bornkessel, & Edemir, 2020). So zeigte sich die Induktion der Expression von Elf5 unter hohen Osmolaritäten bei VHL defizienten Zellen deutlich weniger stark als bei Zellen, welche das VHL Gen exprimieren (Kandabarau et al., 2019).

Schönenberger et al. zeigten, dass unter VHL-Defizienz infolge einer erhöhten Mikrovaskularisierung die Expression von Aquaporin-2 (Aqp2) und somit die Fähigkeit zur Harnkonzentrierung aufgrund eines gestörten osmotischen Gradienten verloren geht (Schönenberger, Rajski, Harlander, & Frew, 2016). Wie bereits in 1.1 erwähnt, wird Aqp2 unter physiologischen Bedingungen durch das Hormon ADH in die Membran des Sammelrohrs eingebaut und führt zu einer Rückresorption von Wasser. In einer Versuchsreihe zeigten VHL defiziente Mäuse aufgrund einer verstärkten Vaskularisation der Medulla das Krankheitsbild eines Diabetes insipidus mit Ausscheidung von unkonzentriertem, hypoosmolarem Urin (Schönenberger et al., 2016). Auf mRNA Ebene wird die Expression von Aqp2 durch cAMP-responsive element-binding protein und durch Nfat5 (auch bekannt als Tonebp) reguliert, welche vermehrt bei hoher Osmolarität exprimiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass microRNA-vermittelt die Expression von Nfat5 beim Nierenzellkarzinom vermindert ist (Bogusławska et al., 2019).

Nicht nur die Aqp2- oder ELF5-Expression ist abhängig vom VHL-Gen. Groß et al. zeigten, dass eine Mutation in besagtem Genabschnitt die Genexpression von mehreren tausend verschiedenen Osmolarität-regulierenden Genen unter erhöhter Osmolarität beeinflusst. Es kommt dabei zu einer Hochregulierung von Genen, die mit einem schlechten klinischen

Outcome bei Patienten assoziiert werden, oder zu einer Herunterregulierung von Genen, die für ein gutes klinisches Outcome stehen (Groß et al., 2020).

Die Osmolarität hat somit einen Einfluss auf die Expression von Genen, ebenso wie das Vorhandensein einer VHL-Mutation Einfluss nimmt auf die Expression Osmolarität-abhängiger Gene. Infolge wird bei einer VHL Defizienz die Funktionsweise der Niere, insbesondere ihre Fähigkeit der Harnkonzentrierung, negativ beeinflusst.

1.6 Der Zellzyklus und seine Rolle beim Nierenzellkarzinom

Eine wichtige Rolle bei der Entstehung eines Tumors ist der Zellzyklus. Ein Entgleisen dieses gut regulierten Prozesses kann eine Krebsentstehung zur Folge haben, beziehungsweise finden sich in vielen Krebszellen fehlgesteuerte Zellzyklusprozesse, die zu einer vermehrten Proliferation führen (Thomasova & Anders, 2015).

Unter dem Zellzyklus versteht man periodisch ablaufende Prozesse, die der Zellteilung dienen. Abbildung 4 zeigt die einzelnen Phasen dieses Prozesses. Die mitotische Zellteilung an sich findet während der M-Phase statt. Dieser schließt sich die Interphase an. Die Interphase gliedert sich wiederum in die G1-, S- und G2-Phase. In der G1-Phase kommt es zu einem Wachstum der Zelle mit der Produktion von Zellbestandteilen wie Zellorganellen oder Replikationsenzymen und Histonen. In dieser Phase liegt in der Zelle ein Ein-Chromatid-Chromosom vor. Darauf folgt die S-Phase, in welcher die Replikation der DNA erfolgt. Dadurch liegt am Ende der S-Phase ein doppelter Chromosomensatz vor. In der G2-Phase bereitet sich die Zelle wieder auf eine mitotische Teilung vor, das Volumen nimmt zu und einige mitosespezifische Proteine und RNA-Moleküle werden gebildet. Manche Zellen treten nach einer Zellteilung in die G0-Phase ein, in der sie bis auf weiteres verweilen. In dieser Phase findet keine weitere Zellteilung statt (Hacker, 2019).

Die Tubulusepithelzellen einer gesunden Niere liegen während eines homöostatischen Zustands in der G0 oder G1 Phase vor. Die Proliferation ist sehr gering. Im Fall einer akuten Zellschädigung, zum Beispiel durch chemische oder physikalische Noxen, wird der Zellzyklus in diesen Zellen wieder aktiviert. Dies kann aber zu einer mitotischen Katastrophe führen, bei der Zellen mit defektem Genmaterial zum Schutz vor einer Krebserkrankung in den Zelltod geschickt werden, wodurch die Niere noch mehr geschädigt wird (Thomasova & Anders, 2015).

Korashy et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass Sunitinib einen Einfluss auf den Zellzyklus ausüben könnte. Sie fanden heraus, dass Sunitinib bei Zellen des Mamma-Karzinoms eine erhöhte Apoptoserate, sowie einen Zellzyklusarrest hervorruft. Dieser sei bedingt durch eine erhöhte Expression des Tumorsuppressorgens p53, sowie eine Inhibition der Gene Cyclin D1 und Cyclin E1, welche eine wichtige Rolle für den Eintritt in die G1/S Phase spielen (Korashy et al., 2017).

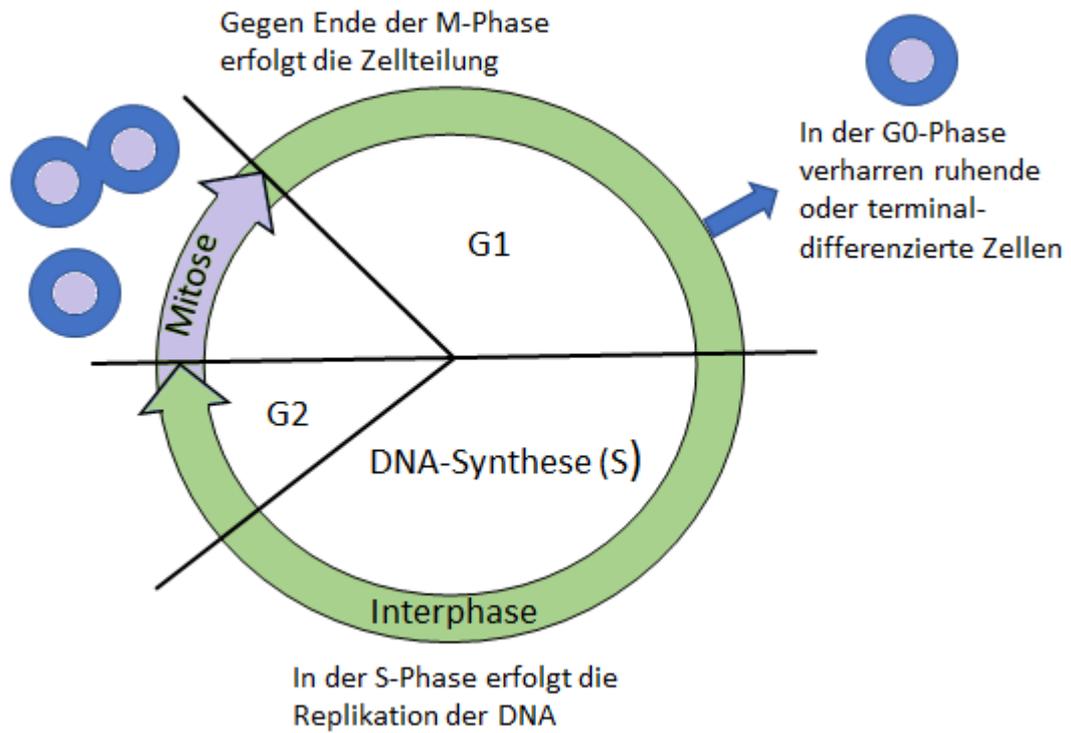


Abb. 4: Zellzyklus. G0 Phase: Zellarrest, G1-Phase: Wachstum, S-Phase: Replikation, G2-Phase: Vorbereitung auf die Mitose, M-Phase: Mitose (verändert nach Hacker, 2019)

2. Zielstellung

Eine erhöhte Osmolarität wirkt sich auf die Expression verschiedenster Gene aus. Eine Mutation im VHL-Gen beeinflusst wiederum die Expression Osmolarität-abhängiger Gene und verändert somit die Resistenz der Zelle für höhere Osmolaritäten, welches mit einem schlechteren klinischen Outcome für die Patienten einhergeht.

In dieser Arbeit bin ich der Frage nachgegangen, ob der Einfluss des Tyrosinkinaseinhibitors Sunitinib bei Zellen mit VHL-Defizienz auf die verschiedenen modulatorischen Effekte des VHL Gens in Kombination mit einer erhöhten Osmolarität einen Effekt auf Wachstum, Koloniebildung und Zellzyklus hat im Vergleich zu VHL überexprimierenden Zellen.

Dazu wurden verschiedene Zellreihen, sowohl VHL exprimierende wie auch VHL defiziente, mit Sunitinib behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen verschiedenen Osmolaritäten ausgesetzt und dahingehend ausgewertet, ob eine höhere Osmolarität die Zellen sensibler für eine Behandlung mit Sunitinib macht.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Analysewaage	Pioneer® Plus, OHAUS Europe GmbH (Greifensee, Schweiz)
Chemoluminiszenzdetektor	ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare (Chicago, Illinois, USA)
Durchflusszytometer	FACSCalibur, Becton Dickinson (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
Fluoreszenz Zellzählgerät	LUNA-FL™ Dual Fluorescence Cell Counter, Logos Biosystems (Anyang-si, Südkorea)
Heizblock	ThermoMixer F1.5, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Inkubator	BBD 6220 CO2-Inkubator, Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Mikroskop	Axio Vert.A1, Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
Spektrophotometer	SPECTRAFLUOR Plus, Tecan (Crailsheim, Deutschland)
Sterilbank	Heraeus HERAsafe KSP, Thermo Fisher Scientific Heraeus HERAsafe KS 12, Thermo Fisher Scientific
Thermocycler	biometra T Gradient , Biometra (Göttingen, Deutschland)
Tischzentrifugen	Heraeus BIOFUGE fresco, Thermo Fisher Scientific Heraeus MULTIFUGE 1 S-R, Thermo Fisher Scientific
Ultrazentrifuge	Sorvall Discovery 100SE UltraCentrifuge, Thermo Fisher Scientific
Waage	APX-3202, Denver Instrument (New York City, New York USA)
Zellkulturflaschen	Zellkulturflasche 75 cm ² , TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz)
Zellkulturplatten	12-Well-Platte, 24-Well-Platte & 96 Well-Platte, TPP Techno Plastic Products AG

3.1.2 Chemikalien und Lösungen

Agarose	Biozym LE Agarose, Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf)
Accutase	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Ampicillin	Sigma Aldrich
Bromphenol Blau	Sigma Aldrich
BSA (Albumin Fraktion V)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth
EDTA	Carl Roth
Essigsäure	Carl Roth
Ethanol	Sigma Aldrich
FKS (FBS Superior)	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)
Geneticin G418	Thermo Fisher Scientific
Glycerol	Sigma Aldrich
Harnstoff	Sigma Aldrich
Methanol	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	Carl Roth
Penicillin/Streptomycin (10 mg/ml)	Biochrom GmbH
PBS (10x)	Sigma Aldrich
Soft Agar (SeaKem® GTG™ Agarose)	Lonza Group AG (Basel, Schweiz)
Tris	Carl Roth
Trypsin – EDTA Lösung	Sigma Aldrich
TSA	Selleckchem (Houston, Texas, USA)

3.1.3 Puffer

Tabelle 1: 50x TAE-Puffer.

Komponente	Endkonzentration
Tris	2 M
EDTA	50 mM
Essigssäure	1 M

pH = 8,0

3.1.4 Nährmedien

Tabelle 2: Verwendete Nährmedien.

Name	Inhalt	Hersteller	Zusätze
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	D-Glucose (4500 mg/l) Na-Pyruvat (110 mg/l)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)	10 % Fötale Kälberserum (FKS) 1 % Penicillin/Streptomycin (Stock: 50 mg/ml) optional: 1% Geneticin G418 (Stock: 50 mg/ml) → für 786-0-VHL Zellen (s. Tabelle 4)
Kryomedium	FKS	Biochrom GmbH (Berlin)	10% Dimethylsulfoxid (DMSO)

3.1.5 Zelllinien

Tabelle 3: Verwendete Zelllinien.

Name	Medium	Verhalten	Herkunft
786-0	DMEM	Adhärent	Humane Nierenkrebszellen eines primären klarzelligen Nierenzellkarzinoms, VHL defizient
786-0-VHL	DMEM	Adhärent	Humane Nierenkrebszellen eines primären klarzelligen Nierenzellkarzinoms mit VHL Überexpression + Geneticin G418 Selektionsmarker
Caki-1	DMEM	Adhärent	Humane Nierenkrebszellen eines metastasierten klarzelligen Nierenzellkarzinoms mit VHL Wildtyp und erhöhter VEGF Produktion
Caki-2	DMEM	adhärent	Humane Nierenkrebszellen eines primären klarzelligen Nierenzellkarzinoms mit VHL Wildtyp und erniedrigter Expression von HIF-2 α

3.1.6 Kits

Tabelle 4: Verwendete Kits.

Kit	Bezeichnung	Hersteller
FACS (Aptoptose Assay)	<i>FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit</i> mit PI (640914)	Biolegend (Koblenz)
Proliferationsassay	CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (G3582)	Promega (Fitchburg, USA)
Zellzahl- und Vitalitäts-Test	AO/PI Cell Viability Kit (872045)	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.2 Zellkulturbedingungen

Sowohl die Zellen der Zelllinie 786-0 (VHL-defizient und überexprimierend), wie auch Caki-1 und Caki-2 (siehe Tabelle 3) wurden in DMEM-Medium (Zusammensetzung und Zusätze siehe Tabelle 2) gehalten. Die Inkubation erfolgte bei einer Temperatur von 37° Celsius, einer 95%igen Luft- und Wasserdampfsättigung und einem CO₂ Wert unter 5%.

3.2.3 Zellsubkultivierung

Für eine optimale Wachstumsrate und eine Gesunderhaltung der Zellen war ein Passagieren der Kulturen alle drei bis vier Tage vonnöten. Dazu wurde zunächst die überschüssige Menge an Medium verworfen und die am Gefäßboden verbliebenen, adhärent wachsenden Zellen mit PBS zweimalig gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Loslösung mithilfe von 5 ml Trypsin/EDTA. Nach einer Inkubationszeit von zirka 10 Minuten im Inkubator bei 37° Celsius wurde die Zellzahl bestimmt (siehe 3.2.4) und auf dieser basierend die gewünschte Menge Zellen der Zellsuspension für Versuche entnommen, beziehungsweise ca. 500.000 Zellen für die weitere Kultivierung wieder mit Medium versetzt in eine neue Zellkulturflasche überführt.

3.2.4 Zellzahlbestimmung

Für eine Zellzahlbestimmung wurde der oben (siehe 3.2.3) beschriebenen mit Trypsin/EDTA versetzten Zellsuspension 18µl entnommen und mit 2µl Acridinorange/Propidiumjodid aus dem AO/PI Cell Viability Kit (siehe Tabelle 4) vermischt. Anschließend wurden die gesamten 20µl in das Zellzählgerät gegeben, in diesem Fall wurde mit dem LUNA-FL™ Dual Fluorescence Cell Counter gearbeitet. Durch verschiedene Fluoreszenzen wurde von dem Gerät die Gesamtzellzahl bestimmt, sowie tote von lebenden Zellen unterschieden.

3.2.5 Erhöhung der Osmolarität

Für einige Versuche war eine Erhöhung der Osmolarität des DMEM Mediums (siehe Tabelle 2) der Zellen wichtig. Dazu wurde dieses mit jeweils 100mM Natriumchlorid und Harnstoff versetzt, sodass sich die Osmolarität von 300 mOsmol/l auf 600 mOsmol/l erhöhte. Dies wurde allerdings schrittweise vollzogen, um den Zellen eine Anpassung zu ermöglichen und so ein erhöhtes Absterben der Zellen zu vermeiden. Dazu wurde das Medium zunächst für einen Tag auf 450 mOsmol/l und am nächsten Tag auf 600 mOsmol/l erhöht.

3.2.6 Colony Forming Assay

Der Colony Forming Assay erlaubt Rückschlüsse auf die Fähigkeit von Zellen Kolonien zu bilden, beziehungsweise die Fähigkeit einer Zelle sich unbegrenzt zu teilen. Diese Eigenschaft haben auch Tumorzellen inne. Der Test bietet somit die Möglichkeit, die tumorbildenden Eigenschaften einer Zelle in vitro nachzuvollziehen (Franken, Rodermond, Stap, Haveman, & van Bree, 2006). Dazu wurde eine 12-Well-Platte mit Base-Agar beschichtet, bestehend aus sterilem 2% (w/v) Soft Agar, gelöst in 1x PBS. Dieser 2% Lösung wurden 1ml entnommen und in 3ml DMEM Medium gelöst, um jeweils 400µl dieser Lösung in die Kavitäten der Platte zu verteilen. Nach dem anschließenden Aushärten des Agars für 30 Minuten bei Zimmertemperatur wurde der Top-Agar aufgetragen. Dazu vermengte man 8ml 37° C warmes DMEM Medium mit 1ml FKS und $1,67 \times 10^5$ Zellen der gewünschten Zelllinie (786-0, 786-0-VHL, Caki-1, Caki-2) und fügte anschließend 1 ml 2% Soft Agar hinzu. Von dieser Mischung wurden je 400µl pro Kavität auf den Base-Agar gegeben. Nach einem erneuten Aushärten wurden noch jeweils weitere 400 µl DMEM Medium in die Kavitäten gegeben. Um unterschiedliche Bedingungen zu schaffen, wurde der Base-Agar in der Hälfte der Fälle zusätzlich mit 100mM Harnstoff und NaCl versetzt, dadurch ergab sich eine erhöhte Osmolarität von 600 mOsmol/l im Vergleich zu 300 mOsmol/l. Auch der Top-Agar und das zuletzt beigefügte Medium wurden entsprechend auf eine höhere Osmolarität hochgesetzt (siehe 3.2.5). Zusätzlich wurden Top-Agar und Medium mit verschiedenen Konzentrationen von Sunitinib versetzt, um unterschiedliche Untersuchungsbedingungen zu schaffen (0µl / 1µl / 5µl). Die 12-Well-Platte wurde im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Wasserdampfsättigung inkubiert. Das zuletzt zugefügte Medium wurde alle 3-4 Tage durch frisches ersetzt.

Zur Auswertung der Kolonieformationen wurden die einzelnen Kavitäten nach 14 Tagen unter dem Lichtmikroskop in 2,5-facher Vergrößerung analysiert (siehe 3.1.1) und auf Kolonien überprüft. Jede Kavität wurde in vier verschiedene Ausschnitte, Quadranten, eingeteilt und fotografiert. Anschließend wurden die Fotos mit dem Programm ImageJ geöffnet, die Kolonien gezählt und deren Durchmesser gemessen. Dazu wurde ein Macro erstellt, das die Hintergrundsignale bis zu einer Grenze von 100 Pixeln abzog, den Schwellenwert des Bildes auf 212 Pixel eingestellt und Partikel der Größe 70-2000 Pixel als Kolonie definiert hat. Die Auszählung der Kolonien erfolgte automatisiert über das Macro. Die Anzahl der Kolonien von vier unabhängig durchgeführten Experimenten (n=4) wurde in GraphPad Prism 5 ausgewertet. Der Mittelwert aus n=4 wurde bestimmt und ein ANOVA-Test zur Überprüfung der statistischen Signifikanz durchgeführt, wobei P<0,05 als statistisch signifikant gilt.

3.2.7 Proliferationsassay

Der Proliferationsassay dient der Bestimmung von teilungsfähigen, vitalen Zellen in vitro. Verwendet wurde dazu das *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit* (siehe Tabelle 5). Das zugrunde liegende Prinzip beruht auf der Funktionsweise des Reagenz 3-(4,5-dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS), welches ausschließlich in stoffwechselaktiven Zellen mit Hilfe von NADH, beziehungsweise NADPH, zu einem Formazan reduziert wird. Dadurch ändert sich das Absorptionsspektrum der Zelle, das Maximum liegt in diesem Fall bei 490nm. Abhängig von der Anzahl der in diesem Spektrum nachweisbaren Zellen lässt sich also die Anzahl vitaler, stoffwechselaktiver und somit teilungsfähiger Zellen bestimmen.

Um den Versuch durchzuführen, wurden 500 Zellen der entsprechenden Zelllinie (786-0, 786-0-VHL, Caki-1, Caki-2) je Kavität in eine 96-Well Zellkulturplatte ausgesät und mit 100µl Medium versetzt. Um unterschiedliche Bedingungen zu schaffen, wurde die Hälfte des Mediums auf eine Osmolarität von 600 mOsmol/l hochgesetzt (im Vergleich zu 300 mOsmol/l). Außerdem wurde in Doppelbestimmung das Medium mit Sunitinib versetzt, sodass die Konzentration jeweils 0µM, 1µM, 10µM und 20µM Sunitinib betrug. Zur Leerwertbestimmung wurden in zwei Kavitäten keine Zellen gesät. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Wasserdampfsättigung im Inkubator. 24 Stunden, beziehungsweise 48 Stunden, nach der Zugabe von Sunitinib wurde in die Kavitäten jeweils 20µl des MTS Reagenz gegeben. Die Auswertung erfolgte nach einer weiteren Inkubation von 2 Stunden. Es wurde mit dem Spektrophotometer (siehe 3.1.1) die Absorption bei einer Wellenlänge von 490nm gemessen. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der Doppelbestimmung bestimmt und die gemessenen Absorptionen vom Mittel des Leerwerts abgezogen. Somit wurde der Effekt des reinen MTS Reagenz herausgerechnet.

3.2.8 Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie

Findet in einer Zelle eine Zellteilung statt, durchläuft diese mehrere Stadien. In jedem dieser Stadien befindet sich also ein unterschiedlicher Gehalt an DNA in der Zelle. Mittels eines DNA-bindenden fluoreszierenden Farbstoffes lässt sich so feststellen in welchem Stadium des Zellzyklus sich die Zelle befindet, da die Fluoreszenz proportional zum DNA-Gehalt ist. Die Fluoreszenz wird mittels Durchflusszytometrie (FACS fluorescence-activated cell sorting) bestimmt, dabei passieren die Zellen einzeln einen Lichtstrahl im Durchflusszytometer, dessen Laser den Farbstoff in den Zellen anregt. Für die Analyse am Durchflusszytometer wurden insgesamt 10 000 Zellen pro Röhrchen gemessen. Die Färbung fand mittels der DNA-interkalierenden Substanz Propidiumiodid (PI) statt.

Zunächst wurden kultivierte Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin gelöst. Die Zellen wurden anschließend bei 1200rpm in der Zentrifuge (siehe 3.1.1) pelletiert und im Anschluss weiter gewaschen. Danach folgte eine dreißigminütige Inkubation mit 70% Ethanol bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen mit Staining Buffer gewaschen und mit RNase (1mg/ml) versetzt. Nach einer dreißigminütigen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mit PI versetzt und inkubierten nochmals bei Raumtemperatur in Dunkelheit bis zur finalen Messung (15-30 Minuten). Es wurden die prozentualen Anteile der einzelnen Phasen des Zellzyklus errechnet. Die Auswertung erfolgte in GraphPad Prism 5. Es wurden drei unabhängig durchgeführte Experimente vorgenommen. Mittels ANOVA-Test wurde die Überprüfung der statistischen Signifikanz durchgeführt, wobei $P < 0,05$ als statistisch signifikant gilt.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss von Sunitinib und Osmolarität auf die Proliferation

Mithilfe eines Proliferationsassays wurde der Einfluss einer Sunitinib-Behandlung auf die Zellreihen Caki-1 und -2 (VHL-Wildtyp), sowie 786-0 untersucht. Caki-1 weist eine erhöhte Expression von VEGF auf, Caki-2 eine erniedrigte Expression von HIF-2 α . Bei der 786-0-Zelllinie gibt es 786-0-VHL Zellen mit überexprimierendem Von-Hippel-Lindau-Gen und VHL-defiziente, ohne Expression des Von-Hippel-Lindau-Gens (im weiteren Verlauf 786-0 genannt). Des Weiteren wurden zwei verschiedene Osmolaritäten (300mOsmol/l und 600 mOsmol/l) gewählt, um deren Einfluss auf die Teilungsfähigkeit der Zellen zu untersuchen. Außerdem wurde eine unterschiedliche Inkubationsdauer von 24 Stunden und 48 Stunden gewählt, um herauszufinden, ob sich der Einfluss von Sunitinib, bzw. der Osmolarität über die Zeit verstärkt darstellt oder sich Resistenzen entwickeln. Die unterschiedlichen Bedingungen wurden mittels Doppelbestimmung und Dreifachbestimmung durchgeführt in jeweils vier unabhängigen Versuchsreihen.

Um die Wirksamkeit einer Sunitinib-Behandlung nachzuweisen, wurden zunächst verschiedene Konzentrationen des Tyrosinkinaseinhibitors bei einer niedrigen Osmolarität von 300 mOsmol/l Medium eingesetzt. Dazu wurden die Werte auf die jeweiligen unbehandelten Kontrollwerte relativiert. Zudem wurde die Abhängigkeit der Proliferation von der Dauer der Inkubation mit Sunitinib dargestellt. Der Tyrosinkinaseinhibitor wurde für 24 Stunden und für 48 Stunden auf die Zellen gegeben. Die Werte wurden ebenfalls auf die jeweiligen niedrigosmolaren Kontrollwerte normalisiert.

Betrachtet man zunächst die Teilungsrate von Zellen der Zelllinien Caki-1 und -2 in einem Behandlungszeitraum von 24 Stunden, zeigt sich eine signifikante Abnahme bei steigender Sunitinib-Konzentration. So ist bei Caki-1 die Teilungsrate bei einer Konzentration von 20 μ m Sunitinib im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollwerten um 75,6% gesunken, bei Caki-2 um 65,4% (siehe Abb. 5).

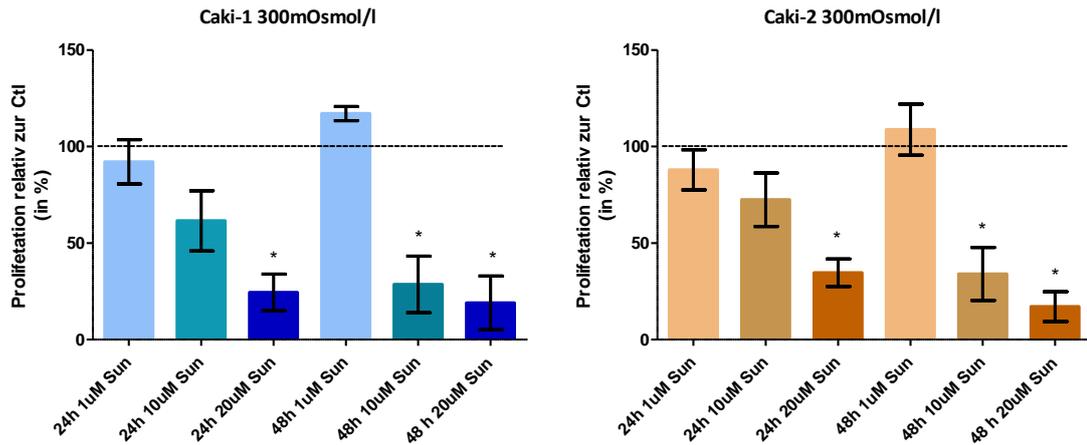


Abb. 5: Einfluss von Sunitinib und Inkubationsdauer auf die Proliferation von Caki-1 und Caki-2. Zu sehen ist die Proliferation unter Sunitinib-Gabe. Abgebildet sind Proliferationsassays aus vier unabhängigen Messreihen in Doppel- beziehungsweise Dreifachbestimmung. Im Folgenden wurden die Mittelwerte bestimmt, diese Werte dann auf die jeweils unbehandelten Kontrollen (100%) normalisiert. Die Sunitinib-Behandlung erfolgte über einen Zeitraum von 24 und 48 Stunden. Die Osmolarität betrug 300mOsmol/l. 1µM, 10µM, 20µM = Endkonzentration von Sunitinib im Medium, * = signifikant zur Kontrolle 100% (n=4, One-way Anova, p-Wert <0,05)

Ein geringerer Effekt zeigt sich hingegen bei beiden 786-0 Zelllinien im Zeitraum von 24 Stunden. Die Proliferation bei der niedrigsten Konzentration von 1µm steigt hier sogar. Statistisch signifikant ist nur die Abnahme der Teilungsrate der beiden Caki Zelllinien. Im Vergleich zur Kontrolle ist die Proliferations bei den VHL-defizienten 786-0 Zellen um 45,9% und bei den 786-0-VHL Zellen um 28,9% gesunken (siehe Abb. 6). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Caki Zelllinien sensibler auf eine Erhöhung der Sunitinib-Konzentration reagieren als die beiden 786-0 Zelllinien, sowie, dass die 786-0-VHL Zellen eine höhere Zellzahl bei hohen Sunitinib-Konzentrationen aufweisen als die VHL defizienten 786-0 Zellen.

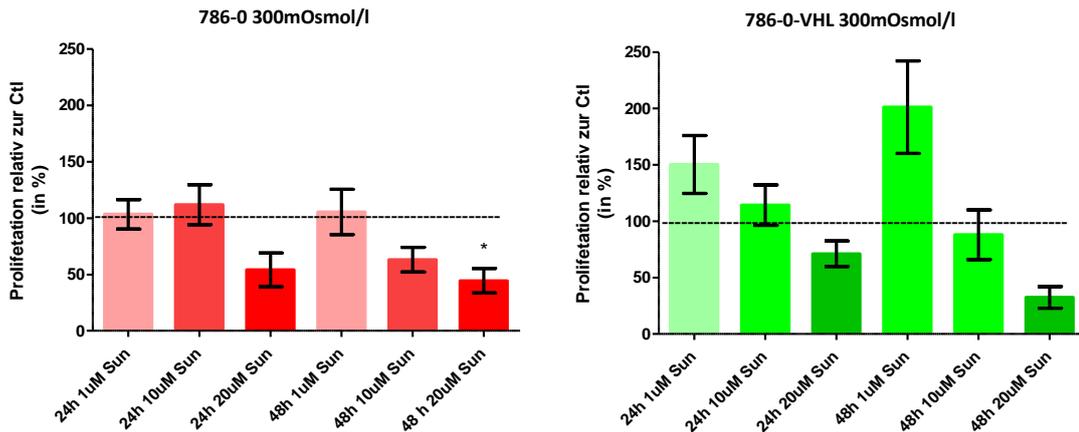


Abb. 6: Einfluss von Sunitinib und Inkubationsdauer auf die Proliferation von 786-0 und 786-0-VHL. Zu sehen ist die Proliferation unter Sunitinib-Gabe. Abgebildet sind Proliferationsassays aus vier unabhängigen Messreihen in Doppel- beziehungsweise Dreifachbestimmung. Im Folgenden wurden die Mittelwerte bestimmt, diese Werte dann auf die jeweils unbehandelten Kontrollen (100%) normalisiert. Die Sunitinib-Behandlung erfolgte über einen Zeitraum von 24 und 48 Stunden. Die Osmolarität betrug 300mOsmol/l. 1µM, 10µM, 20µM = Endkonzentration von Sunitinib im Medium, (n=4, One-way Anova, p-Wert <0,05)

Hinsichtlich der Inkubationsdauer lässt sich in Abb. 5 und 6 ein Rückgang der Proliferation bei 48h im Vergleich zu 24h erkennen. Die Inkubationsdauer scheint bei den 786-0 Zelllinien stärker Einfluss auf das Wachstum der VHL-exprimierenden Zellen zu nehmen als auf die VHL-defizienten Zellen. So verringert sich das Wachstum bei den 786-0-VHL Zellen bei hoher Sunitinib-Konzentration im Vergleich zwischen 24h und 48h um 38,6%, bei den VHL-defizienten 786-0 Zellen um lediglich 9,7%. Beide Werte sind nicht statistisch signifikant (eine Signifikanz wird nur zur Kontrolle erreicht).

Zwischen den Zelllinien Caki-1 und Caki-2 zeigt sich lediglich bei Sunitinib-Konzentrationen von 10µM ein Unterschied zwischen kurzer und langer Inkubationsdauer, welcher aber nicht signifikant ist. Bei einer Sunitinib-Konzentration von 20µM zeigt sich eher kein Effekt einer längeren Inkubationsdauer auf die Proliferation.

In einem zweiten Schritt wurde wiederum ein Proliferationsassay verwendet, um nun den Einfluss der Osmolarität auf die Zellen zu untersuchen. Betrachtet wurden also lediglich die nicht mit Sunitinib behandelten Kontrollwerte für 300 mOsmol/l und 600 mOsmol/l, wobei die Werte für 600 mOsmol/l auf die 300 mOsmol/l normalisiert wurden.

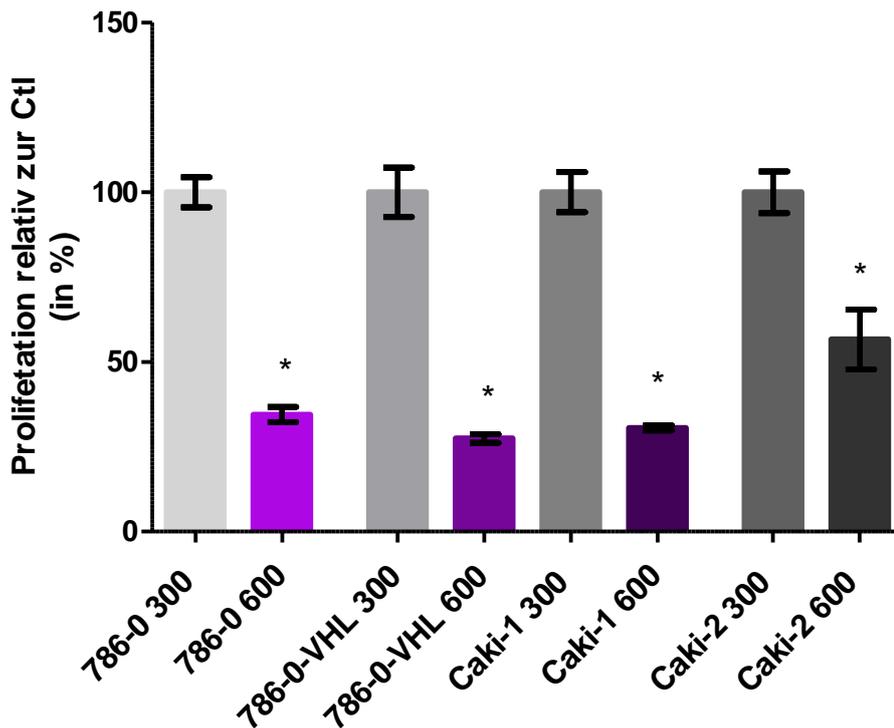


Abb. 7: Einfluss der Osmolarität auf die Proliferation der unbehandelten Kontrollen von 786-0, 786-0-VHL, Caki-1 und Caki-2. Zu sehen ist der Einfluss der Osmolarität auf die Proliferation. Abgebildet sind Proliferationsassays aus vier unabhängigen Messreihen in Doppelbeziehungswise Dreidachbestimmung. Im Folgenden wurden die Mittelwerte bestimmt, diese Werte dann auf die unbehandelten (300mOsmol/l) Kontrollen relativiert. Die Inkubationszeit mit dem Medium erfolgte über einen Zeitraum von 24 Stunden. 300 = 300mOsmol/l, 600 = 600mOsmol/l, * = signifikant zur 300mOsmol/l (n=4, One-way Anova, p-Wert <0,05)

Es zeigt sich bei allen Zellreihen eine deutliche Abnahme der Proliferation bei einer Erhöhung der Osmolarität auf 600mOsmol/l. Sowohl die 786-0, 786-0-VHL wie auch die Caki-1 Zellen scheinen ähnlich auf erhöhte Osmolaritäten zu reagieren. Lediglich die Caki-2 Zelllinie zeigt eine im Vergleich zu den anderen Zelllinien weniger stark erniedrigte Proliferation auf. So hat die Zellzahl bei hohen Osmolaritäten im Vergleich zu 300mOsmol/l hier um lediglich 43,4% abgenommen, bei 786-0-VHL hingegen um 72,5% (siehe Abb. 7).

Interessant ist nun die Frage, ob die Proliferation der Zellen bei erhöhter Osmolarität sensitiver ist für eine Behandlung mit Sunitinib, beziehungsweise eine geringere Konzentration Sunitinib bei höheren Osmolaritäten ausreicht, um ähnliche Effekte zu erzielen wie eine hohe Konzentration bei niedrigen Osmolaritäten. Dazu wurden die Zellen unter verschiedenen Konzentrationen von Sunitinib sowohl niedriger (300mOsmol/l) wie auch hoher (600mOsmol/l) Osmolarität ausgesetzt.

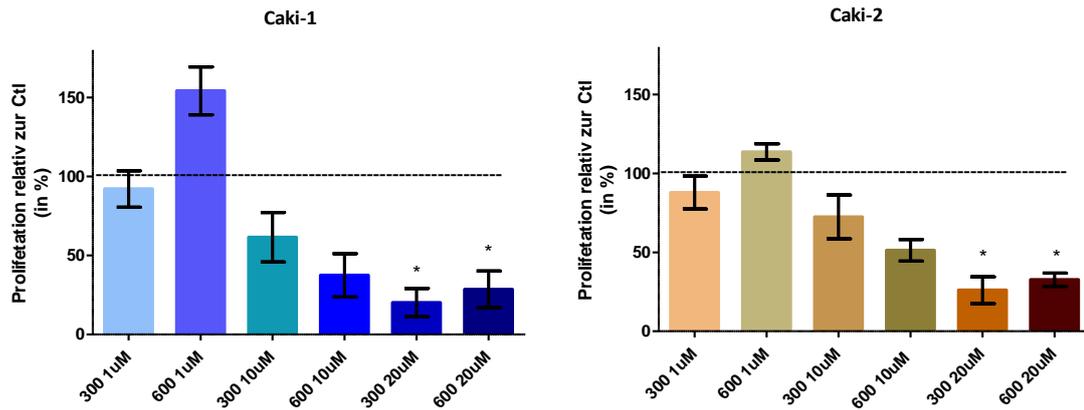


Abb. 8: Einfluss von Sunitinib und Osmolarität auf die Proliferation der Caki-1 und Caki-2. Zu sehen ist die Proliferation in Relation zur Kontrolle unter Einfluss erhöhter Sunitinib Konzentration (1/10/20µM) und der Osmolarität (300mOsmol/l und 600mOsmol/l). Abgebildet sind Proliferationsassays aus vier unabhängigen Messreihen in Doppel- beziehungsweise Dreifachbestimmung mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden. Im Folgenden wurden die Mittelwerte bestimmt, diese Werte dann auf die jeweiligen unbehandelten Kontrollen relativiert (300mOsmol/l bzw. 600mOsmol/l ohne Sunitinib). 1/10/20µM = Endkonzentration von Sunitinib im Medium, 300 = 300mOsmol/l, 600 = 600mOsmol/l, * = signifikant zur Kontrolle 100% (n=4, One-way Anova, p-Wert <0,05)

Man erkennt bei allen Zelllinien eine statistisch signifikante Abnahme der Proliferation bei erhöhter Sunitinib-Konzentration, dieser Effekt wird bereits in Abbildung 5 und 6 beschrieben. Der Unterschied zwischen hoher und niedriger Osmolarität ist allerdings weniger eindeutig. Bei den 786-0 Zelllinien sieht man eine Tendenz zur verminderten Proliferation bei erhöhter Osmolarität (Abb. 9). Bei den Caki Zelllinien hingegen steigt die Proliferation bei Konzentrationen von 20µM und hoher Osmolarität sogar an. Tendenzen sieht man hier nur bei 10µM Sunitinib (Abb. 8).

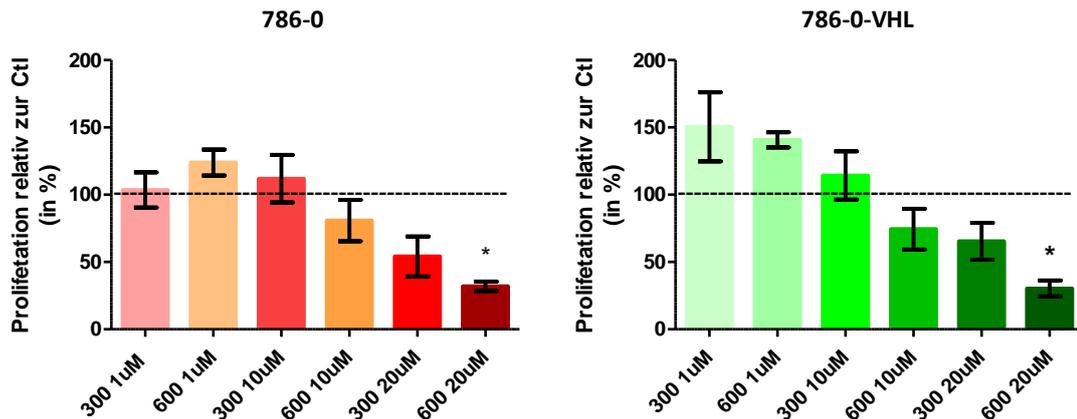


Abb. 9: Einfluss von Sunitinib und Osmolarität auf die Proliferation der 786-0 und 786-0-VHL. Zu sehen ist die Proliferation in Relation zur Kontrolle unter Einfluss erhöhter Sunitinib Konzentration (1/10/20 μM) und der Osmolarität (300mOsmol/l und 600mOsmol/l). Abgebildet sind Proliferationsassays aus vier unabhängigen Messreihen in Doppel- beziehungsweise Dreifachbestimmung mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden. Im Folgenden wurden die Mittelwerte bestimmt, diese Werte dann auf die jeweiligen unbehandelten Kontrollen relativiert (300mOsmol/l bzw. 600mOsmol/l ohne Sunitinib). 1/10/20 μM = Endkonzentration von Sunitinib im Medium, 300 = 300mOsmol/l, 600 = 600mOsmol/l, * = signifikant zur Kontrolle 100% (n=4, One-way Anova, p-Wert <0,05)

Im Hinblick auf die Frage, ob eine Dosisreduktion bei Erhöhung der Osmolarität sinnvoll sein könnte, zeigt sich die Tendenz, dass unter einer hohen Osmolarität bei einer Sunitinib-Konzentration von 10 μM eine höhere Proliferation auftritt, als bei einer niedrigen Osmolarität mit hoher Sunitinib-Konzentration (20 μM). Das spricht zunächst gegen die Möglichkeit einer Dosisreduktion. Es besteht allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Testergebnissen. Bei einer Sunitinib-Konzentration von 1 μM steigt die Zellzahl bei hoher Osmolarität (außer bei 786-0-VHL) sogar an.

Insgesamt kann man schlussfolgern, dass sowohl bei erhöhten Osmolaritäten wie auch bei einer erhöhten Konzentration von Sunitinib die Proliferation der Zellen abnimmt, diese bei höheren Osmolaritäten aber nicht sensibler auf Sunitinib reagieren als bei niedrigen.

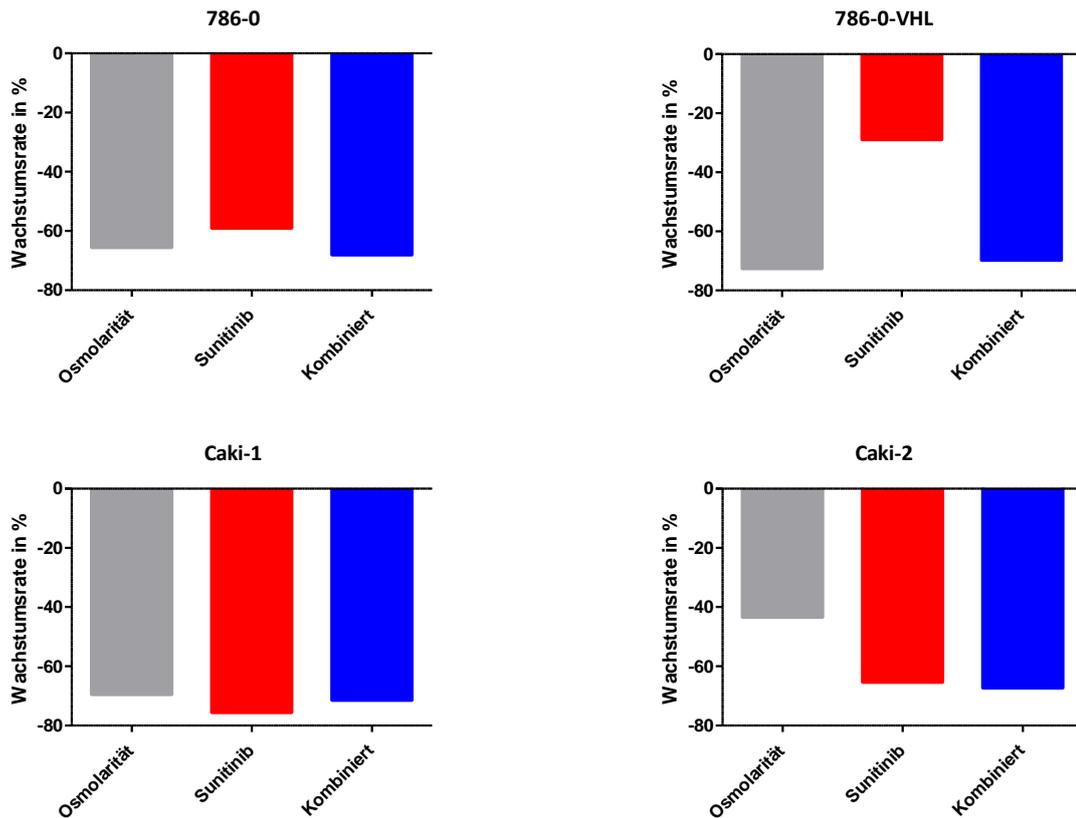


Abb. 10: Wachstumsrate der Proliferationsassays. Zu sehen ist die Wachstumsrate der Zellen bei erhöhter Sunitinib Konzentration (20 μ m) und Osmolarität (600mOsmol/l), sowie einer Kombination aus beiden. Abgebildet sind Daten von Proliferationsassays aus vier unabhängigen Messreihen in Doppel- beziehungsweise Dreifachbestimmung mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden. Im Folgenden wurde das Wachstum in Relation zur Kontrolle (100%) bestimmt, dazu wurden Mittelwerte ohne Statistik verwendet.

Dies ist auch in Abbildung 10 erkennbar. Zu sehen sind die Wachstumsraten von Zellen, die nur einer erhöhten Osmolarität (600mOsmol/l), nur einer hohen Sunitinib-Konzentration (20 μ m) und beidem in Kombination ausgesetzt waren. Es wurden die Werte von den Kontrollwerten subtrahiert.

In allen Fällen zeigt sich ein Rückgang des Wachstums im Vergleich zu den Kontrollen, man erkennt aber keinen verstärkten Rückgang bei einer kombinierten Gabe von hoher Osmolarität und hoher Sunitinib-Konzentration. Die 786-0-VHL Zellen scheinen weniger sensibel auf Sunitinib zu reagieren, als die VHL-defizienten 786-0 Zellen. Bei den Caki Zelllinien scheint Sunitinib einen größeren Einfluss auf die Wachstumsrate zu haben als die Osmolarität, Caki-2 reagiert am schlechtesten auf eine hohe Osmolarität.

4.2 Einfluss von Sunitinib und Osmolarität auf die tumorbildenden Eigenschaften

Ein Colony Forming Assay erlaubt Rückschlüsse auf die Fähigkeit von Zellen, Kolonien zu bilden und gibt somit Auskunft über die tumorbildenden Eigenschaften dieser Zellen. Dabei spiegelt die Anzahl an Kolonien und deren Größe die Fähigkeit von Zellen wider, im Körper einen Tumor zu bilden und diesen wachsen zu lassen. Im Folgenden wurden beide Zellreihen unter verschiedenen Osmolaritäten (300mOsmol/l und 600mOsmol/l) und verschiedenen Konzentrationen von Sunitinib (1 μ M und 5 μ M) in einem Soft Agar kultiviert und nach zwei Wochen unter dem Mikroskop beurteilt. Dazu wurde sowohl die Anzahl der gebildeten Kolonien wie auch die Größe (Durchmesser) der Kolonien gemessen. Im Folgenden ist ein Ausschnitt der mikroskopischen Aufnahmen zu sehen, die zur Auswertung herangezogen wurden. In den folgenden Diagrammen hingegen ist die Gesamtheit der erfassten Daten mithilfe des Programms GraphPad Prism ausgewertet worden.

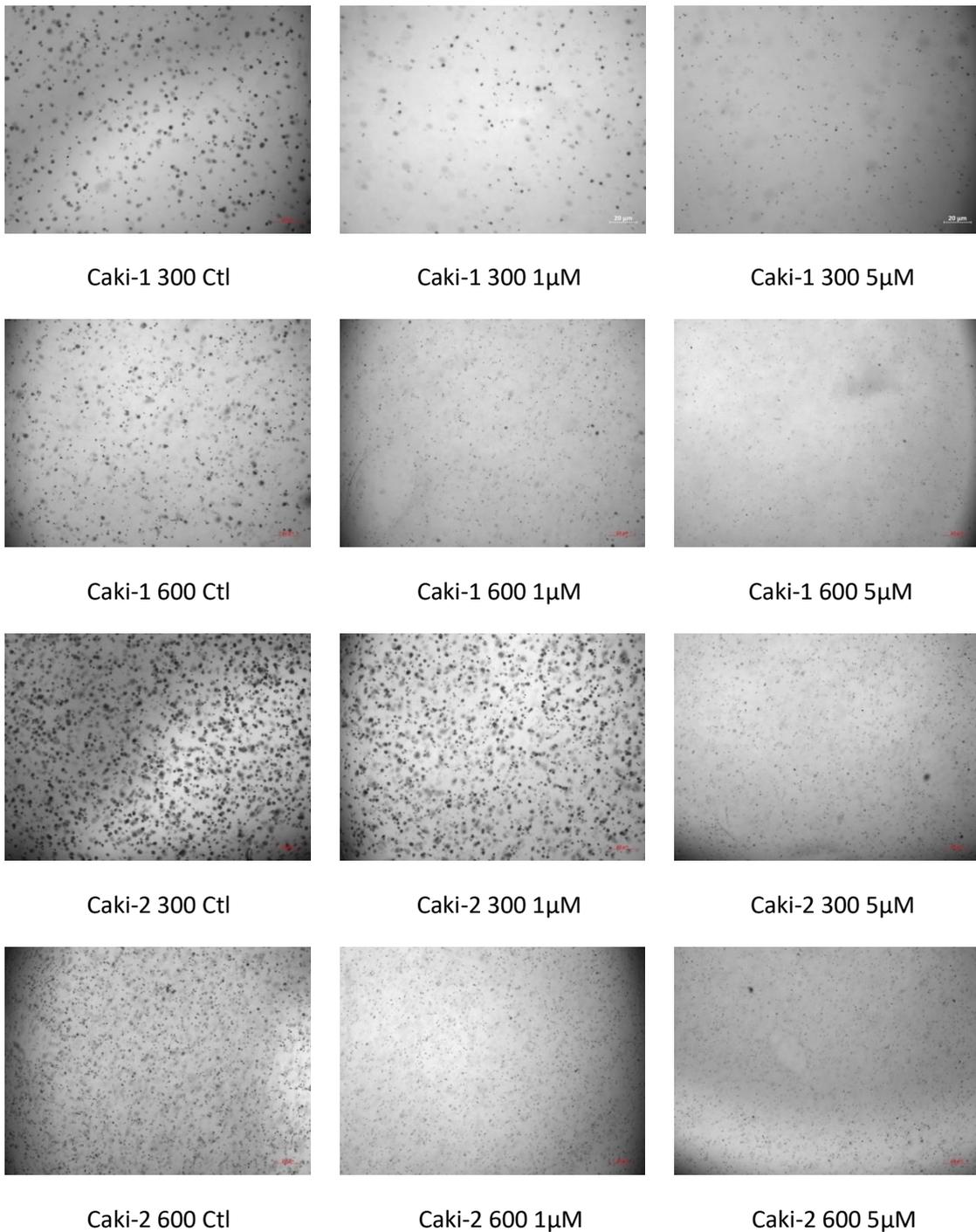


Abb. 11: Ausschnitt eines Soft Agar Assays mit Caki-1 und Caki-2 in 300mOsmol/l Medium und 600mOsmol/l Medium nach 14 Tagen Inkubationszeit. Die Zellen wurden wie in Kapitel 4.1.5 unter verschiedenen Bedingungen in einem Agarosegel ausgesät. Zu sehen ist ein jeweiliger Ausschnitt aus einer Kavität einer 12-Well-Platte. Die Versuche wurden pro Bedingung in Doppelbestimmung durchgeführt. Pro Kavität wurden vier verschiedene Fotos unter dem Mikroskop angefertigt. Die Auswertung erfolgte mithilfe des Programms ImageJ, durch welches die Kolonien in jedem Ausschnitt ausgezählt und vermessen wurden.

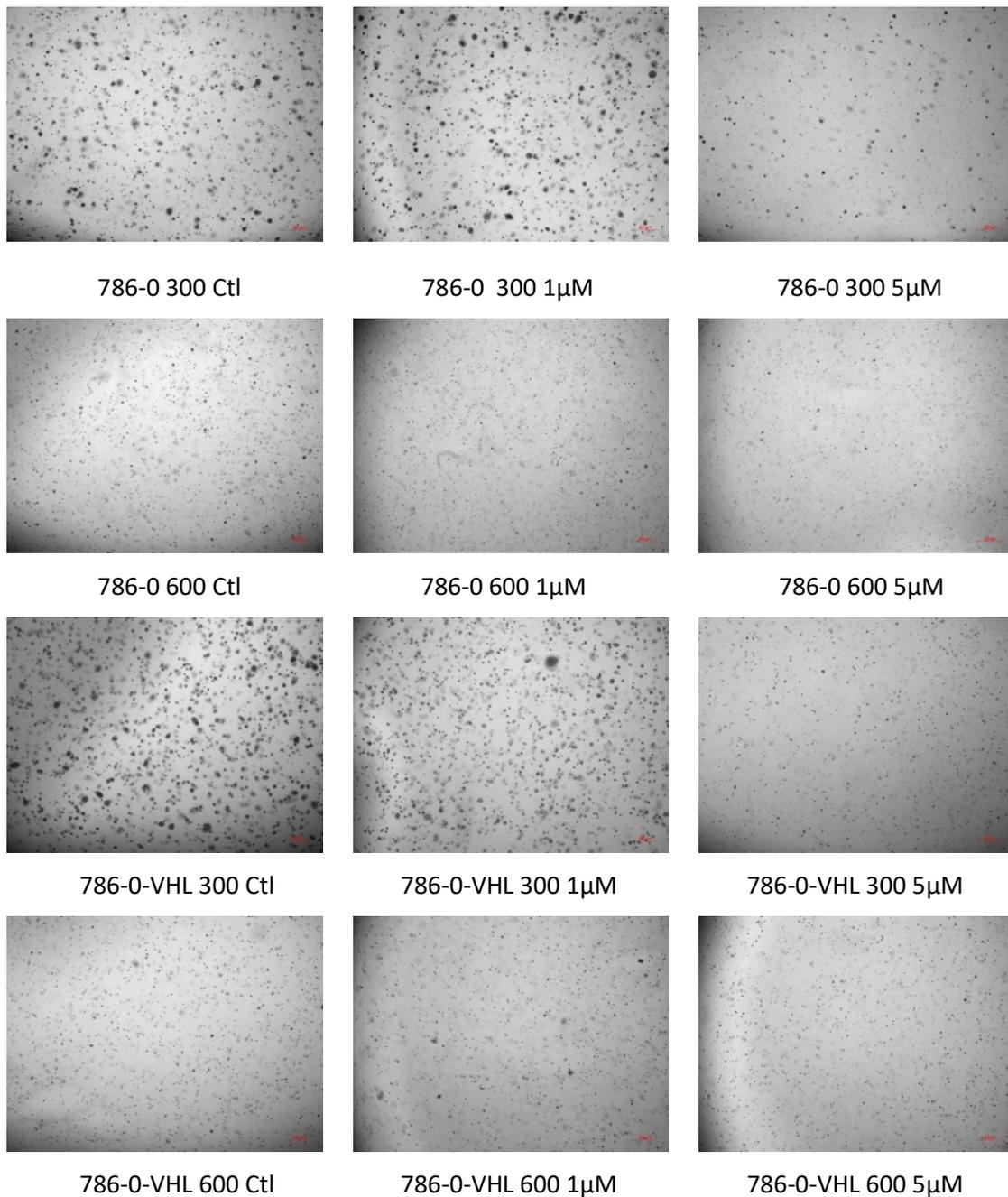


Abb. 12: Ausschnitt eines Soft Agar Assays mit 786-O und 786-O-VHL in 300mOsmol/l Medium und 600mOsmol/l Medium nach 14 Tagen Inkubationszeit. Die Zellen wurden wie in Kapitel 4.1.5 unter verschiedenen Bedingungen in einem Agarosegel ausgesät. Zu sehen ist ein jeweiliger Ausschnitt aus einer Kavität einer 12-Well-Platte. Die Versuche wurden pro Bedingung in Doppelbestimmung durchgeführt. Pro Kavität wurden vier verschiedene Fotos unter dem Mikroskop angefertigt. Die Auswertung erfolgte mithilfe des Programms ImageJ, durch welches die Kolonien in jedem Ausschnitt ausgezählt und vermessen wurden.

Um zu sehen welchen Einfluss die Osmolarität auf die koloniebildenden Eigenschaften der Zellen darstellt, wurden zunächst lediglich die Kontrollen ohne Sunitinib unter den verschiedenen hohen Osmolaritäten beurteilt.

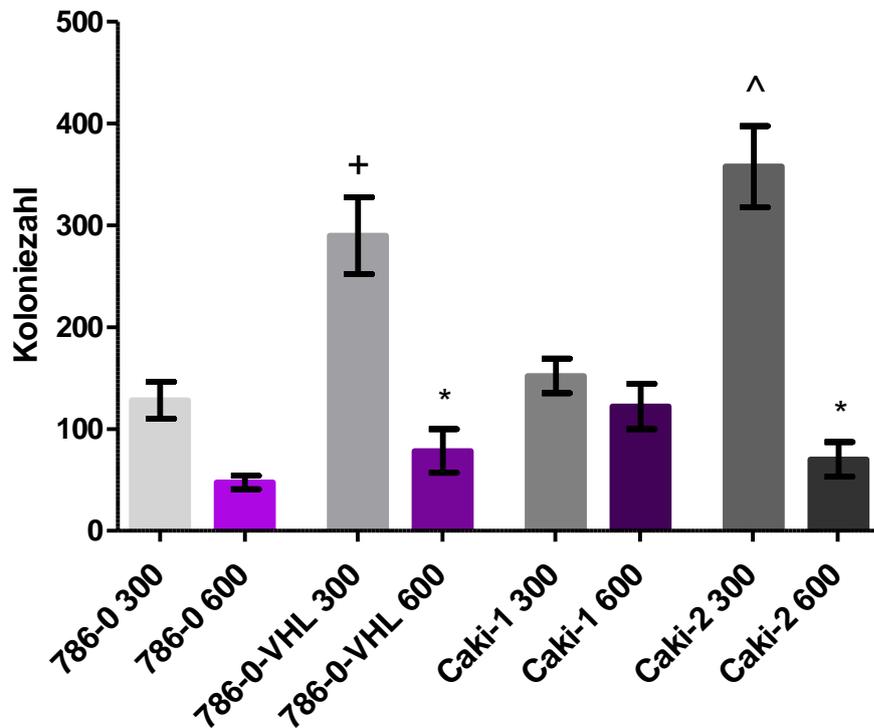


Abb. 13: Einfluss der Osmolarität auf die Koloniezahl bei 786-0, 786-0-VHL, Caki-1 und Caki-2. Zu sehen ist die Koloniezahl unter Einfluss einer erhöhten Osmolarität. Abgebildet sind Daten aus vier (786-0 Zelllinien) beziehungsweise drei (Caki) unabhängigen Messreihen in Doppelbestimmung. Die Inkubationszeit mit dem Medium erfolgte über einen Zeitraum von zwei Wochen. 300 = 300mOsmol/l, 600 = 600mOsmol/l, * = signifikant zu 300mOsmol/l, + = signifikant zu 786-0 300 Ctl, ^ = signifikant zu Caki-1 300 Ctl (n>3, One-way Anova, p-Wert <0,05)

Betrachtet man zunächst die Entwicklung der Anzahl an Kolonien, so sieht man eine Abnahme an Kolonien je höher die Osmolarität ist. Signifikant ist der Unterschied allerdings nur bei den 786-0-VHL Zellen, wo die Koloniezahl bei 600mOsmol/l 216 Kolonien weniger zählt als bei 300mOsmol/l und bei den Caki-2 Zellen mit einem Unterschied von 287 Kolonien zwischen den Osmolaritäten (siehe Abb. 13). Außerdem sieht man eine signifikant höhere Anzahl an Kolonien (161 Kolonien mehr) bei den 786-0-VHL Zellen im Vergleich zu den 786-0 Zellen bei 300mOsmol/l. VHL-überexprimierende Zellen scheinen über bessere tumorbildende Eigenschaften zu verfügen, als VHL-defiziente Zellen. Diese Zunahme an Kolonien fällt auch bei den Caki-2 Zellen auf, die im Vergleich zu den Caki-1 Zellen bei 300mOsmol/l 205 Kolonien mehr aufweisen (siehe Abb. 13).

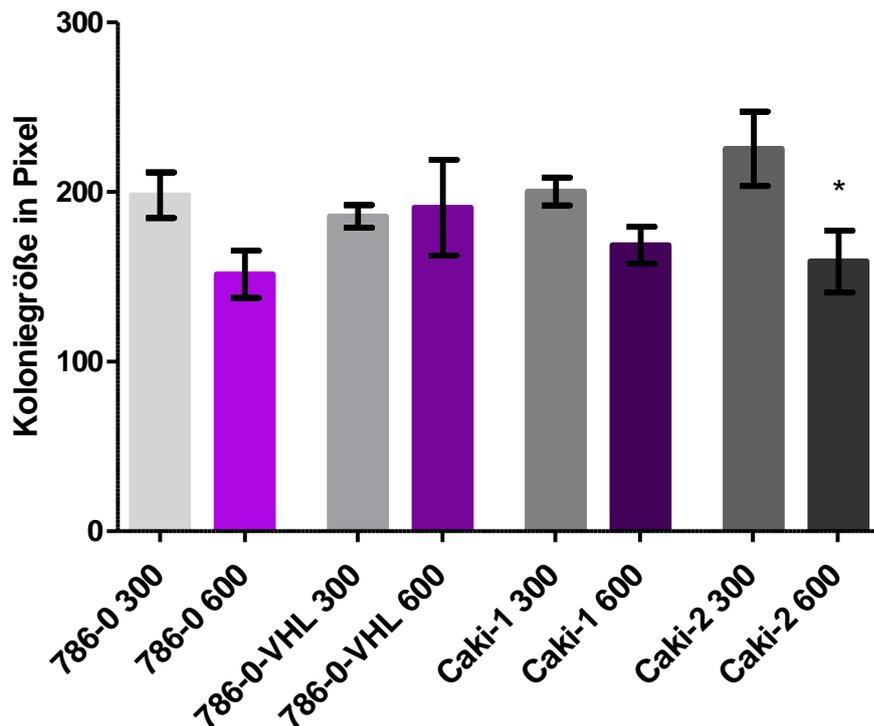


Abb. 14: Einfluss der Osmolarität auf die Koloniegröße bei 786-0, 786-0-VHL, Caki-1 und Caki-2. Zu sehen ist die Koloniegröße unter Einfluss einer erhöhten Osmolarität. Abgebildet sind Daten aus vier (786-0 Zelllinien) beziehungsweise drei (Caki) unabhängigen Messreihen in Doppelbestimmung. Die Inkubationszeit mit dem Medium erfolgte über einen Zeitraum von zwei Wochen. 300 = 300mOsmol/l, 600 = 600mOsmol/l, * = signifikant zu 300mOsmol/l (n>3, One-way Anova, p-Wert <0,05)

Anders hingegen stellt sich die Entwicklung der Koloniegröße dar. Hier erkennt man keine Abhängigkeit zwischen der Osmolarität auf die Größe der gebildeten Kolonien. Lediglich bei den Caki-2 Zellen sieht man einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen 600mOsmol/l und 300mOsmol/l (siehe Abb. 14). Auch zwischen den 786-0 und 786-0-VHL Zellen, beziehungsweise Caki-1 und Caki-2 Zellen, bei niedriger Osmolarität erkennt man keinen Unterschied (siehe Abb. 14).

Als nächstes wurde der Einfluss von Sunitinib auf die Zellreihen 786-0 und Caki untersucht. Dazu wurden jeweils zwei verschiedene Konzentrationen an Sunitinib dem Nährmedium hinzugegeben (1µM und 5µM).

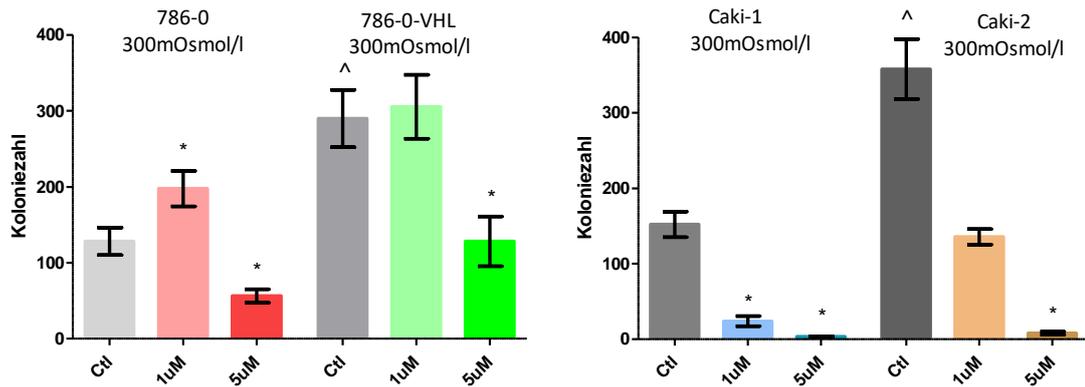


Abb. 15: Einfluss von Sunitinib auf die Koloniezahl bei 786-0, 786-0-VHL, Caki-1 und Caki-2 bei 300mOsmol/l. Zu sehen ist die Koloniezahl unter Einfluss von Sunitinib mit den Konzentrationen 0µM / 1µM / 5µM. Abgebildet sind Daten aus vier (786-0 Zelllinien) bzw. drei (Caki) unabhängigen Messreihen in Doppelbestimmung. Die Inkubationszeit mit dem Medium erfolgte über einen Zeitraum von zwei Wochen. Ctl = Kontrollen ohne Sunitinib, 1µM / 5µM = Endkonzentration von Sunitinib im Medium, * = signifikant zur Kontrolle, ^ = signifikant zu 786-0, resp. Caki-1 Ctl (n>3, One-way Anova, p-Wert <0,05)

Betrachtet man zunächst die 786-0 Zelllinien, so lässt sich feststellen, dass die Koloniezahl der 786-0-VHL Zellen in unbehandeltem Zustand mehr als zwei Mal so hoch ist, wie die der 786-0 Zellen, dieser Effekt wurde bereits in Abb. 13 beschrieben. Des Weiteren erkennt man eine Zunahme der Koloniezahl bei 1µM Sunitinib im Vergleich zu den Kontrollen. Bei 5µM Sunitinib hingegen nimmt die Koloniezahl im Vergleich zu den Kontrollen signifikant ab, sowohl bei den 786-0 wie auch bei den 786-0-VHL Zellen um mehr als die Hälfte (siehe Abb. 15).

Auch bei den Caki Zelllinien sind Unterschiede in der Koloniezahl erkennbar. Es zeigt sich eine signifikante Abnahme der Koloniezahl sowohl bei den Caki-1 wie auch bei den Caki-2 Zellen bei einer Sunitinib-Konzentration von 5µM im Vergleich zur Kontrolle. Die Koloniezahl ist bei den Caki-2 Zellen signifikant höher als bei den Caki-1 Zellen (siehe Abb. 15). Die Abnahme der Koloniezahl generell ist bei den Caki-1 und Caki-2 Zellen deutlich stärker ausgeprägt als bei den 786-0 Zelllinien. Sie scheinen somit sensitiver auf Sunitinib zu reagieren, als die 786-0 Zelllinien.

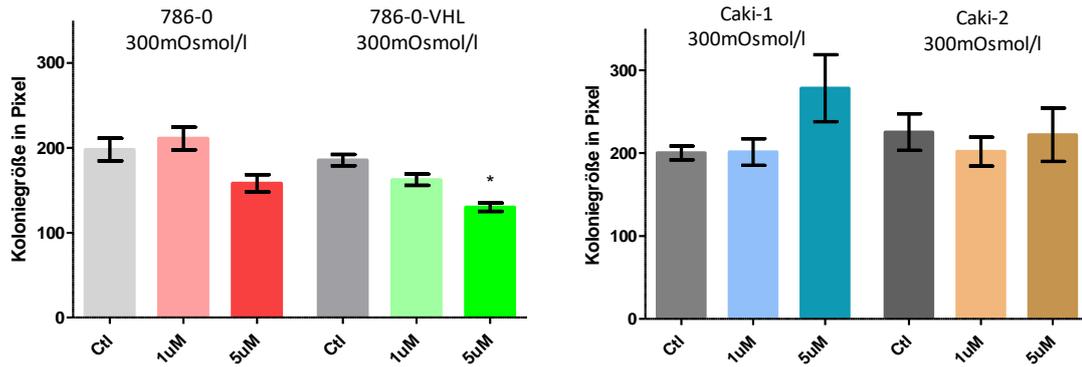


Abb. 16: Einfluss von Sunitinib auf die Koloniegröße bei 786-0, 786-0-VHL, Caki-1 und Caki-2 bei 300mOsmol/l. Zu sehen ist die Koloniegröße unter Einfluss von Sunitinib mit den Konzentrationen 0µM / 1µM / 5µM. Abgebildet sind Daten aus vier (786-0 Zelllinien) beziehungsweise drei (Caki) unabhängigen Messreihen in Doppelbestimmung. Die Inkubationszeit mit dem Medium erfolgte über einen Zeitraum von zwei Wochen. Ctl = Kontrollen ohne Sunitinib, 1µM / 5µM = Endkonzentration von Sunitinib im Medium, * = signifikant zur Kontrolle, (n>3, One-way Anova, p-Wert <0,05)

Betrachtet man hingegen die Entwicklung der Koloniegröße bei den 786-0 Zelllinien, erkennt man eine Abnahme der Koloniegröße lediglich in einem statistisch signifikanten Ausmaß bei den 786-0-VHL Zellen. Hier nimmt die Größe bei 5µM um ca. 30% im Vergleich zu den Kontrollwerten ab (siehe Abb. 16). Bei den Caki Zelllinien ist keine signifikante Abnahme bei der Koloniegröße erkennbar, bei den Caki-1 Zellen scheint die Koloniegröße bei 5µM sogar anzusteigen.

In der folgenden Graphik (Abb. 17) ist dargestellt, inwiefern eine erhöhte Osmolarität die Zellen sensibler macht für eine Behandlung mit Sunitinib. Dazu wurden Sunitinib-Konzentrationen von 1µM und 5µM verwendet.

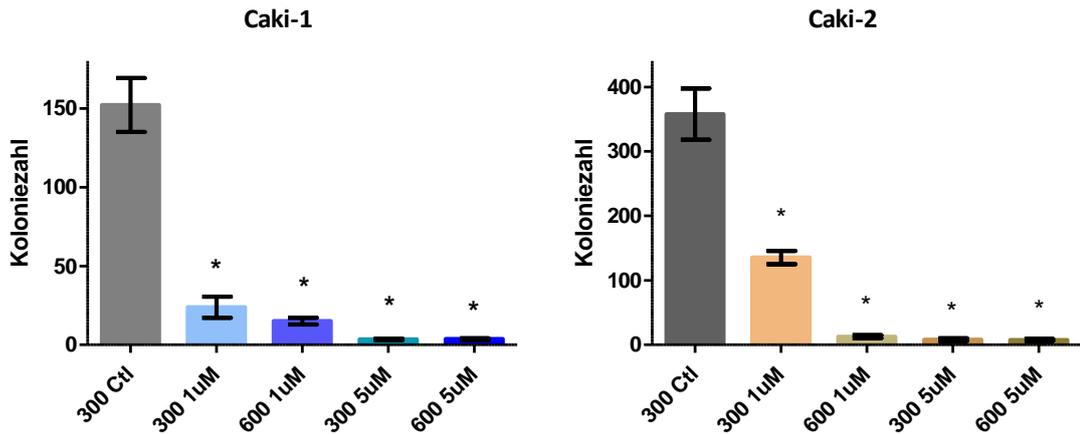


Abb. 17: Einfluss von Osmolarität und Sunitinib auf die Koloniezahl bei Caki-1 und Caki-2. Zu sehen ist die Koloniezahl unter Einfluss von Sunitinib der Konzentration 1 μ M / 5 μ M und verschiedenen Osmolaritäten (300mOsmol/l und 600mOsmol/l). Abgebildet sind Daten aus drei unabhängigen Messreihen in Doppelbestimmung. Die Inkubationszeit mit dem Medium erfolgte über einen Zeitraum von zwei Wochen. Ctl = Kontrollen ohne Sunitinib, 1 μ M/5 μ M = Endkonzentration von Sunitinib im Medium, 300 = 300mOsmol/l, 600 = 600mOsmol/l, * = signifikant zur Kontrolle (n=3, One-way Anova, p-Wert <0,05)

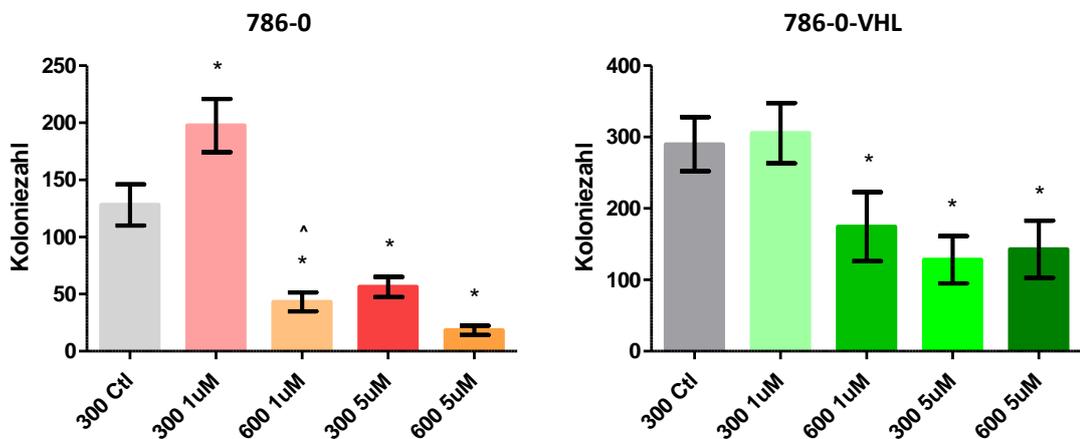


Abb. 18: Einfluss von Osmolarität und Sunitinib auf die Koloniezahl bei 786-0- und 786-0-VHL. Zu sehen ist die Koloniezahl unter Einfluss von Sunitinib der Konzentration 1 μ M/5 μ M und verschiedenen Osmolaritäten (300mOsmol/l und 600mOsmol/l). Abgebildet sind Daten aus vier unabhängigen Messreihen in Doppelbestimmung. Die Inkubationszeit mit dem Medium erfolgte über einen Zeitraum von zwei Wochen. Ctl = Kontrollen ohne Sunitinib, 1 μ M/5 μ M = Endkonzentration von Sunitinib im Medium, 300 = 300mOsmol/l, 600 = 600mOsmol/l, * = signifikant zur Kontrolle, ^ = signifikant zu 300 1 μ M (n=4, One-way Anova, p-Wert <0,05)

Beide Caki Zelllinien reagieren auf erhöhte Sunitinib-Konzentration, sowie eine erhöhte Osmolarität, allerdings zeigen sich ansonsten keine weiteren statistisch signifikanten Änderungen zwischen den Osmolaritäten und Konzentrationen (abgesehen von Caki-2 1 μ M 300

zu 600mOsmol/l). Ähnlich verhält es sich bei den 786-0-VHL Zellen. Lediglich bei den VHL-defizienten 786-0 Zellen lässt sich ein Unterschied zwischen 300mOsmol/l und 600mOsmol/l erkennen, dieser ist aber nur bei niedriger Konzentration statistisch signifikant. Dies lässt vermuten, dass die Zellen zwar sowohl auf erhöhte Osmolaritäten wie auch auf erhöhte Konzentrationen an Sunitinib mit einer verminderten Koloniebildung reagieren, nicht jedoch gesteigert anfällig sind für eine Sunitinib-Behandlung bei erhöhten Osmolaritäten. Möglicherweise ist bei den Caki Zelllinien die Koloniezahl bereits zu gering, um Unterschiede erkennen zu können.

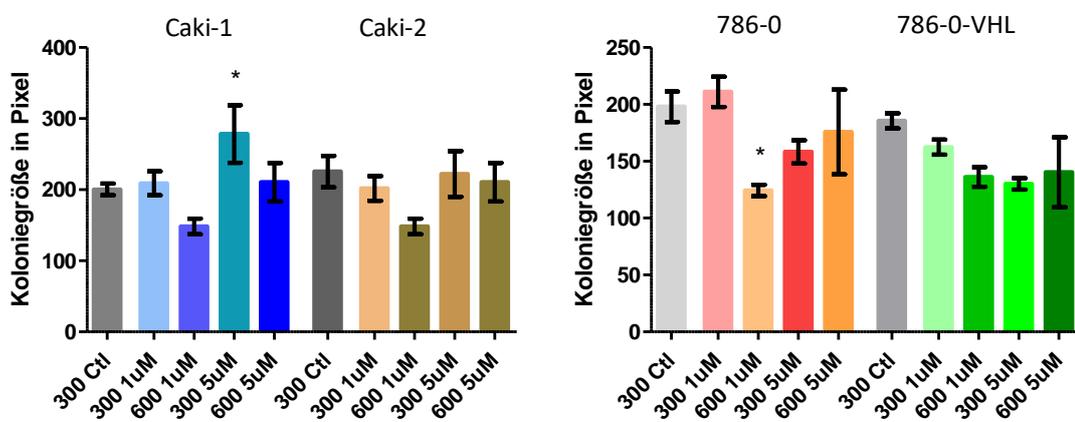


Abb. 19: Einfluss von Osmolarität und Sunitinib auf die Koloniegröße bei 786-0, 786-0-VHL, Caki-1 und Caki-2. Zu sehen ist die Koloniegröße unter Einfluss von Sunitinib der Konzentration 1µM/5µM und verschiedenen Osmolaritäten (300mOsmol/l und 600mOsmol/l). Abgebildet sind Daten aus vier (786-0 Zelllinien) beziehungsweise drei (Caki) unabhängigen Messreihen in Doppelbestimmung. Die Inkubationszeit mit dem Medium erfolgte über einen Zeitraum von zwei Wochen. Ctl = Kontrollen ohne Sunitinib, 1µM/5µM = Endkonzentration von Sunitinib im Medium, 300 = 300mOsmol/l, 600 = 600mOsmol/l, * = signifikant zur Kontrolle (n>3, One-way Anova, p-Wert <0,05)

Hinsichtlich der Koloniegröße sieht man lediglich bei den VHL-defizienten 786-0 Zellen bei einer Sunitinib-Konzentration von 1µM eine signifikante Verkleinerung bei höheren Osmolaritäten, bei Caki-1 scheint die Koloniegröße bei 5µM anzusteigen. Bei den Caki Zelllinien zeigt sich eine leichte Tendenz zu kleineren Koloniegrößen bei höheren Osmolaritäten, diese ist allerdings nicht statistisch signifikant.

In der folgenden Graphik (Abb. 20) sind die Wachstumsraten für die Koloniezahl dargestellt, also der Wachstumsrückgang im Vergleich zu den Kontrollen und zwar sowohl für eine Behandlung mit hoher Osmolarität (600mOsmol/l), wie auch mit hoher Sunitinib-Konzentration (5µM) und einer kombinierten Gabe. Dazu wurden die Werte von den Kontrollwerten subtrahiert.

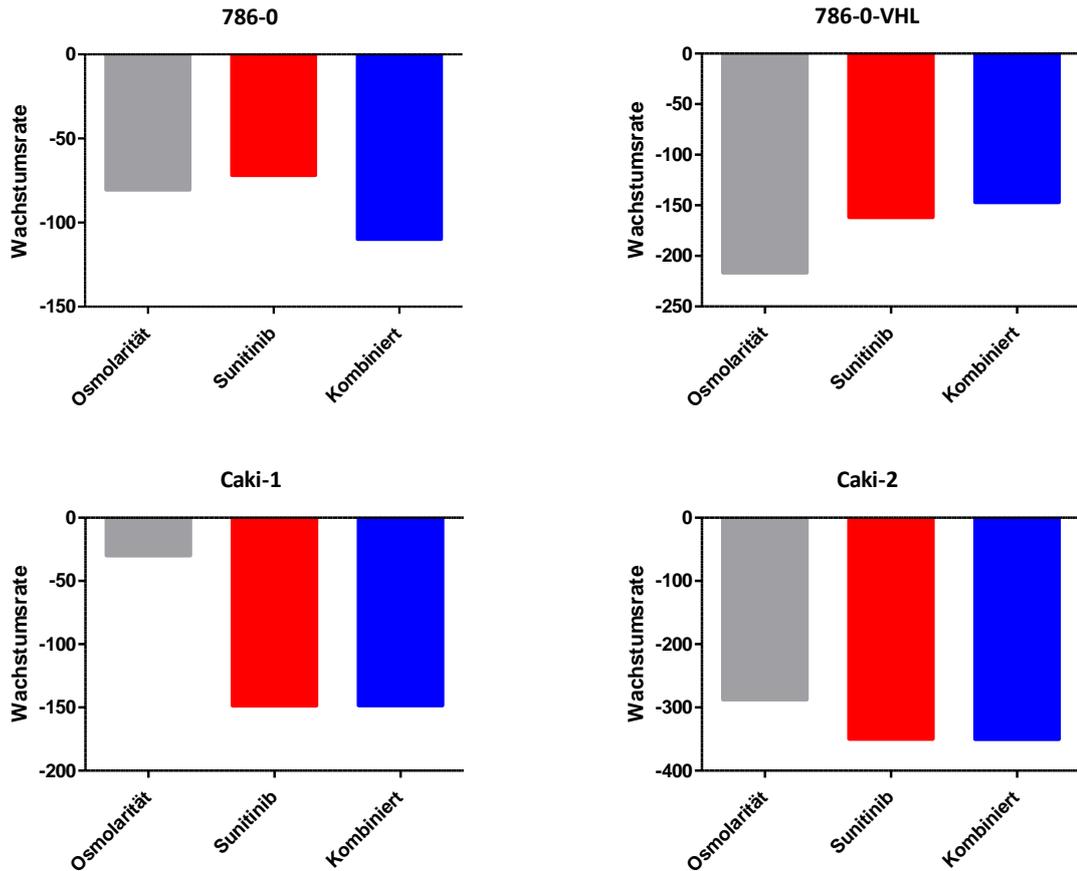


Abb. 20: Wachstumsrate der Colony Forming Assays. Zu sehen ist die Wachstumsrate der Zellen bei erhöhter Sunitinib-Konzentration ($5\mu\text{m}$) und Osmolarität (600mOsmol/l), sowie einer Kombination aus beiden. Abgebildet sind die Daten aus vier (786-0 Zelllinien) beziehungsweise drei (Caki) unabhängigen Messreihen in Doppelbestimmung. Die Inkubationszeit mit dem Medium erfolgte über einen Zeitraum von zwei Wochen. Im Folgenden wurde das Wachstum in Relation zur Kontrolle (unbehandelt, 300mOsmol/l) bestimmt, dazu wurden Mittelwerte ohne Statistik verwendet.

Man erkennt bei den Caki Zelllinien keinen zusätzlichen Effekt einer kombinierten Gabe von Sunitinib und hoher Osmolarität. Die Zellen scheinen eher auf Sunitinib als auf die Osmolarität zu reagieren. Bei den VHL-defizienten 786-0 Zellen zeigt sich die Tendenz zu einer Wirkungsverstärkung einer kombinierten Gabe, bei den 786-0-VHL Zellen eher eine protektive Wirkung.

4.3 Einfluss von Sunitinib und Osmolarität auf den Zellzyklus

Da der Zellzyklus eine große Rolle für die Krebsentstehung und -entwicklung spielt, wurde im Folgenden untersucht, wie sich die Verteilung der Zellzyklusstadien in den Krebszellen 786-0, 786-0-VHL, Caki-1 und Caki-2 darstellt und wie sie sich unter Sunitinib-Gabe, beziehungsweise erhöhter Osmolarität verändert. Dabei wurde vor allem auch betrachtet, ob sich die oben gezeigte verminderte Proliferation in einem Zellzyklusarrest widerspiegelt. Abbildung 21 zeigt beispielhaft für „Caki-1 300mOsmol/l Kontrolle“ die Datengewinnung mittels Durchflusszytometrie. Es wurden für jede Bedingung 10.000 Zellen gemessen. Aufgeschlüsselt anhand der unterschiedlichen Wellenlängen konnte so eine Zuordnung zu einem Stadium des Zellzyklus erfolgen (siehe Kapitel 3.2.8).

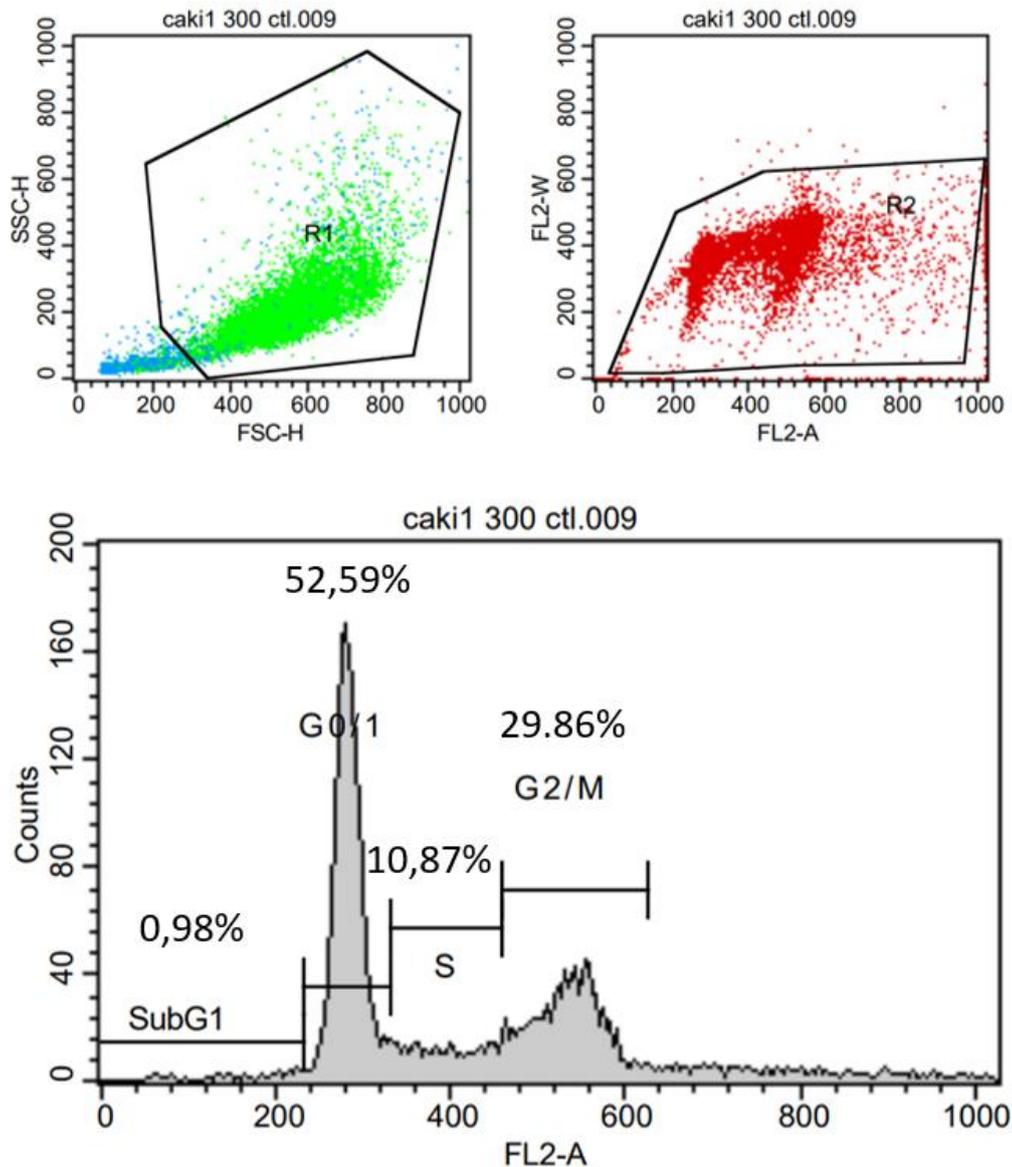


Abb. 21: Durchflusszytometrie zur Zellzyklusanalyse. Exemplarisch für Caki-1 300mOsmol/l Kontrolle. Die Zellen wurden mit der DNA-interkalierenden Substanz Propidiumiodid inkubiert und jeweils 10.000 Zellen pro Röhrchen am FACS analysiert. Oben links: Auswahl der untersuchten Zellen unter Ausschluss von toten Zellen und Zellfragmenten. Oben rechts: Auswahl des Fluoreszenzspektrums, Ausschluss nicht fluoreszierender Zellen. Unten: Prozentuale Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen (Sub-G1, G0/1, S, G2/M) des Zellzyklus, unterteilt anhand der verschiedenen Wellenlängen. SSC-H: side scatter; FSC-H: forward scatter; FL2-A Fluoreszenz

Besonders interessant sind bei einer Zellzyklusanalyse die G0/1 Phase und die G2/M Phase.

Beide sind in den folgenden beiden Graphiken abgebildet. In Abbildung 22 sind die Daten für die G0/1 Phase der 786-0 Zelllinien dargestellt.

G0/1 Phase 786-0

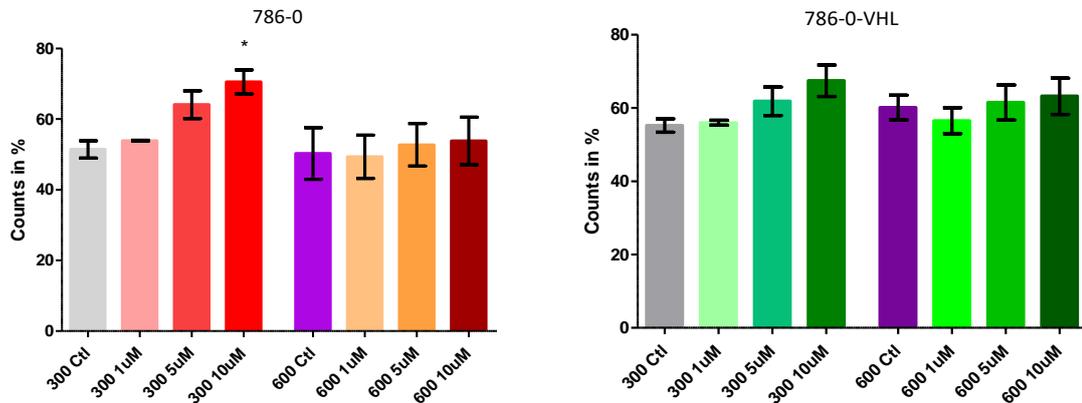


Abb. 22: Einfluss von Osmolarität und Sunitinib auf den Zellzyklus bei 786-0 und 786-0-VHL G0/1 Phase. Zu sehen sind die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die prozentualen Anteile an gezählten Zellen in einer jeweiligen Phase des Zellzyklus (G0/1) unter Einfluss von Sunitinib der Konzentrationen 1µM, 5µM und 10µM, sowie verschiedenen Osmolaritäten (300mOsmol/l und 600mOsmol/l). Abgebildet sind Daten aus drei unabhängigen Messreihen. Ctl = Kontrollen ohne Sunitinib, 1µM/5µM/10µM = Endkonzentration von Sunitinib im Medium, 300 = 300mOsmol/l, 600 = 600mOsmol/l, * = signifikant zur Kontrolle (n=3, One-way Anova, p-Wert <0,05)

Man erkennt, dass der prozentuale Anteil der Zellen, die sich in der G0/1 Phase befinden, zunimmt, je höher die Sunitinib-Konzentration wird. Dieser Effekt ist allerdings nur bei niedrigen Osmolaritäten zu beobachten und nur bei den VHL-defizienten 786-0 Zellen statistisch signifikant.

G2/M Phase 786-0

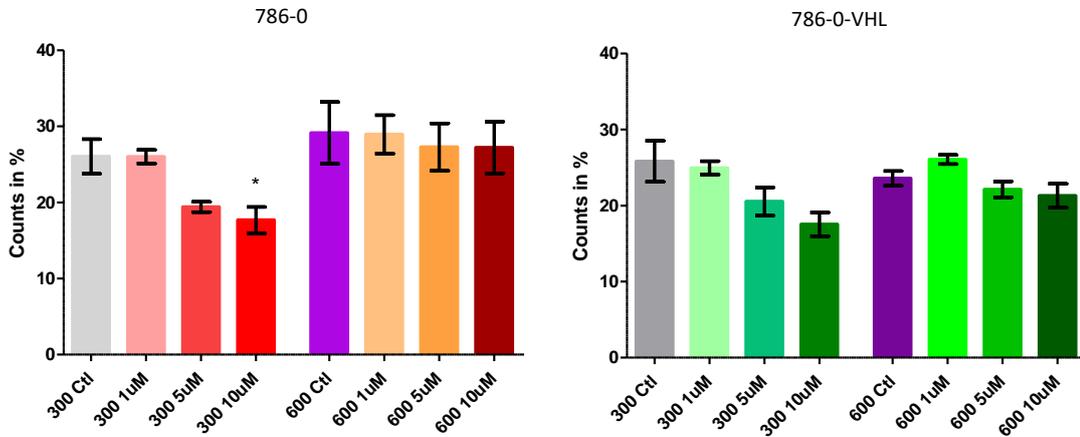


Abb. 23: Einfluss von Osmolarität und Sunitinib auf den Zellzyklus bei 786-0 und 786-0-VHL G2/M Phase. Zu sehen sind die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die prozentualen Anteile an gezählten Zellen in einer jeweiligen Phase des Zellzyklus (G2/M) unter Einfluss von Sunitinib der Konzentrationen 1µM, 5µM und 10µM, sowie verschiedenen Osmolaritäten (300mOsmol/l und 600mOsmol/l). Abgebildet sind Daten aus drei unabhängigen Messreihen. Ctl = Kontrollen ohne Sunitinib, 1µM/5µM/10µM = Endkonzentration von Sunitinib im Medium, 300 = 300mOsmol/l, 600 = 600mOsmol/l, * = signifikant zur Kontrolle (n=3, One-way Anova, p-Wert <0,05)

Der gegenteilige Effekt lässt sich in Abbildung 23, die die G2/M Phase darstellt, erkennen. Je höher die Konzentration an Sunitinib, desto weniger Zellen konnten in dieser Phase nachgewiesen werden. Auch hier begrenzt sich der Effekt auf niedrige Konzentrationen und ist nur für VHL-defizienten 786-0 Zellen statistisch signifikant.

Auch bei den Caki Zelllinien lassen sich die oben beschriebenen Veränderungen feststellen. Diese sind allerdings weniger stark ausgeprägt als bei den 786-0 Zelllinien und statistisch nicht signifikant. So steigt der Anteil an Zellen in der G0/1 Phase bei niedrigen Osmolaritäten bei den VHL-defizienten 786-0 Zellen zwischen den Kontrollen und 10µM Sunitinib um 19,1%, während er bei den Caki-1 Zellen bei niedrigen Osmolaritäten um nur 12,7% zunimmt (siehe Abb. 24).

G0/1 Phase Caki

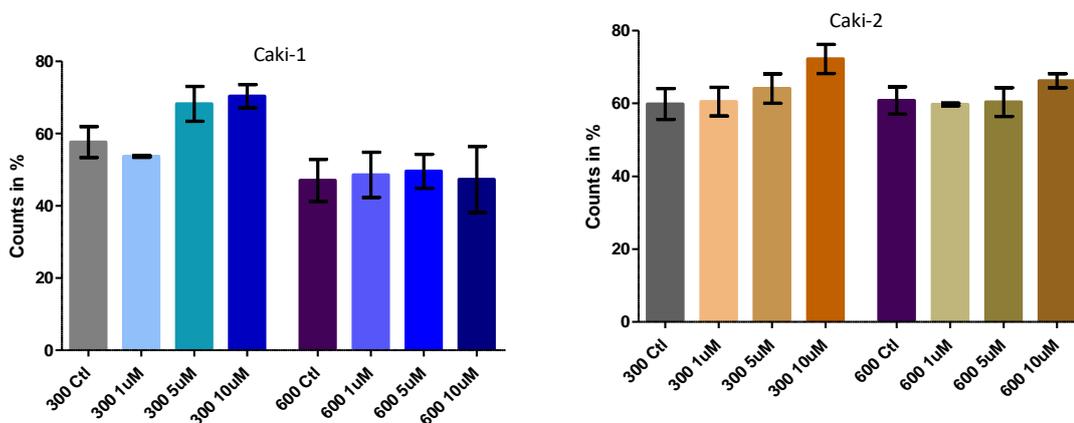


Abb. 24: Einfluss von Osmolarität und Sunitinib auf den Zellzyklus bei Caki-1 und Caki-2 G0/1 Phase. Zu sehen sind die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die prozentualen Anteile an gezählten Zellen in einer jeweiligen Phase des Zellzyklus (G0/1) unter Einfluss von Sunitinib der Konzentrationen 1µM, 5µM und 10µM, sowie verschiedenen Osmolaritäten (300mOsmol/l und 600mOsmol/l). Abgebildet sind Daten aus drei unabhängigen Messreihen. Ctl = Kontrollen ohne Sunitinib, 1µM/5µM/10µM = Endkonzentration von Sunitinib im Medium, 300 = 300mOsmol/l, 600 = 600mOsmol/l (n=3, One-way Anova, p-Wert <0,05)

G2/M Phase Caki

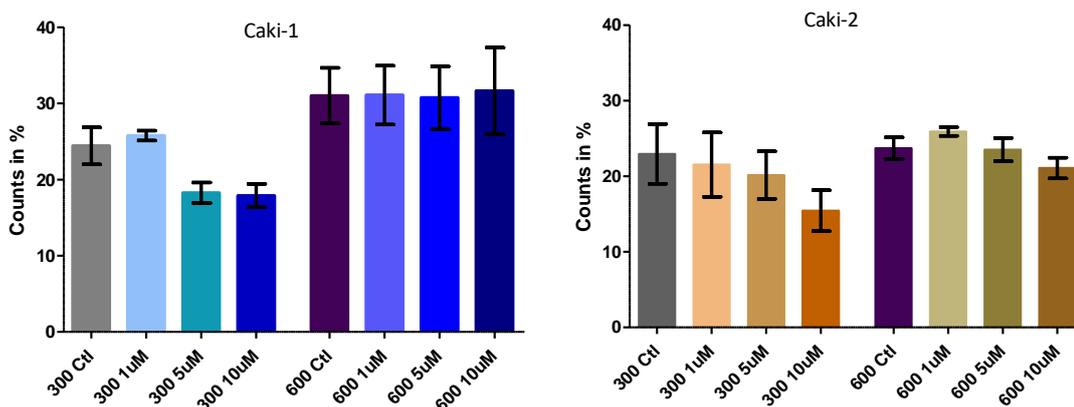


Abb. 25: Einfluss von Osmolarität und Sunitinib auf den Zellzyklus bei Caki-1 und Caki-2 G2/M Phase. Zu sehen sind die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die prozentualen Anteile an gezählten Zellen in einer jeweiligen Phase des Zellzyklus (G2/M) unter Einfluss von Sunitinib der Konzentrationen 1µM, 5µM und 10µM, sowie verschiedenen Osmolaritäten (300mOsmol/l und 600mOsmol/l). Abgebildet sind Daten aus drei unabhängigen Messreihen. Ctl = Kontrollen ohne Sunitinib, 1µM/5µM/10µM = Endkonzentration von Sunitinib im Medium, 300 = 300mOsmol/l, 600 = 600mOsmol/l (n=3, One-way Anova, p-Wert <0,05)

In den anderen Phasen des Zellzyklus ist lediglich während der S Phase (Abbildung 26 und 27) eine Veränderung erkennbar. Hier scheint es die Tendenz zu geben, dass bei höherer Sunitinib-Konzentration der prozentuale Anteil an Zellen in dieser Phase abnimmt. Dieser Effekt ist aber wiederum nur bei niedrigen Osmolaritäten zu erkennen und nicht statistisch signifikant. Die sogenannte Sub G1 Phase (Abb 28 und 29) zeigt fragmentierte, apoptotische Zellen mit vermindertem DNA-Gehalt und gibt den Anteil an apoptotischen Zellen an. Es zeigt sich kein Effekt unter erhöhter Osmolarität oder Sunitinib-Konzentration bei den 786-0 und Caki-1 Zelllinien. Bei den 786-0-VHL und Caki-2 Zellen scheint eine erhöhte Osmolarität die Anzahl der apoptotischen Zellen zu senken, diese Effekte sind allerdings nicht statistisch signifikant.

S Phase 786-0

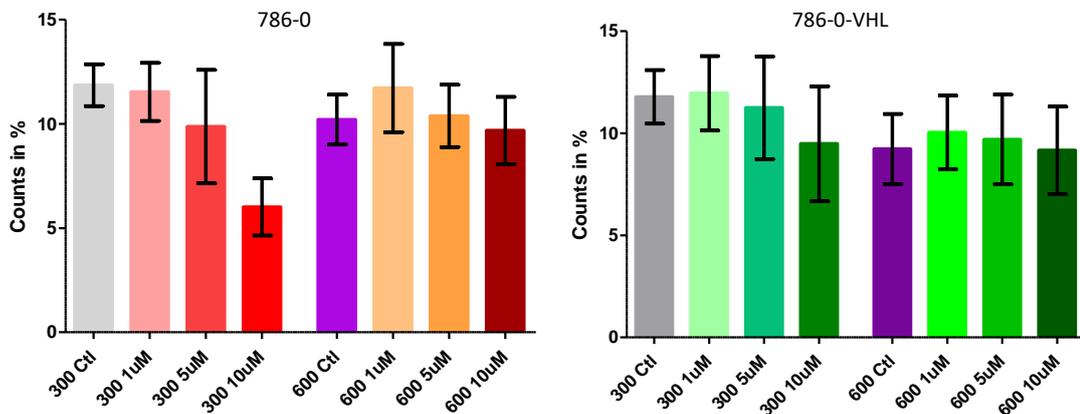


Abb. 26: Einfluss von Osmolarität und Sunitinib auf den Zellzyklus bei 786-0 und 786-0-VHL S Phase. Zu sehen sind die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die prozentualen Anteile an gezählten Zellen in einer jeweiligen Phase des Zellzyklus (S Phase) unter Einfluss von Sunitinib der Konzentrationen 1µM, 5µM und 10µM, sowie verschiedenen Osmolaritäten (300mOsmol/l und 600mOsmol/l). Abgebildet sind Daten aus drei unabhängigen Messreihen. Ctl = Kontrollen ohne Sunitinib, 1µM/5µM/10µM = Endkonzentration von Sunitinib im Medium, 300 = 300mOsmol/l, 600 = 600mOsmol/l (n=3, One-way Anova, p-Wert <0,05)

S Phase Caki

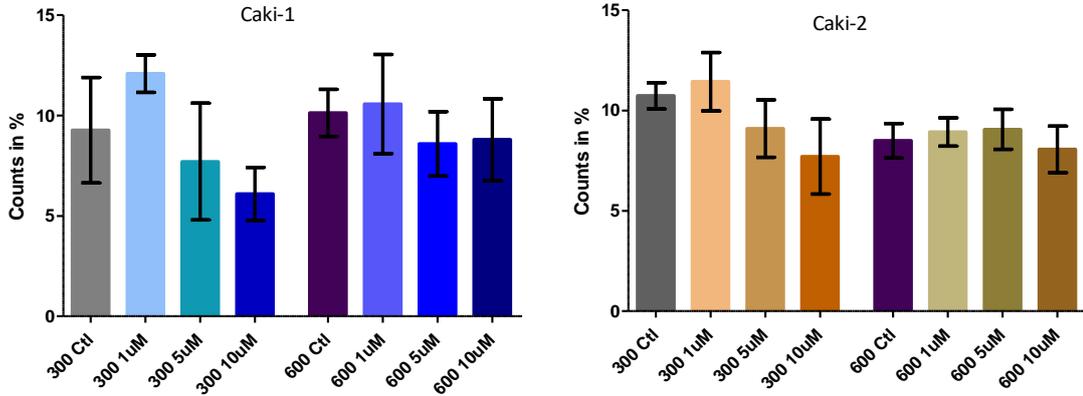


Abb. 27: Einfluss von Osmolarität und Sunitinib auf den Zellzyklus bei Caki-1 und Caki-2 S Phase. Zu sehen sind die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die prozentualen Anteile an gezählten Zellen in einer jeweiligen Phase des Zellzyklus (S Phase) unter Einfluss von Sunitinib der Konzentrationen 1µM, 5µM und 10µM, sowie verschiedenen Osmolaritäten (300mOsmol/l und 600mOsmol/l). Abgebildet sind Daten aus drei unabhängigen Messreihen. Ctl = Kontrollen ohne Sunitinib, 1µM/5µM/10µM = Endkonzentration von Sunitinib im Medium, 300 = 300mOsmol/l, 600 = 600mOsmol/l (n=3, One-way Anova, p-Wert <0,05)

Sub G1 Phase 786-0

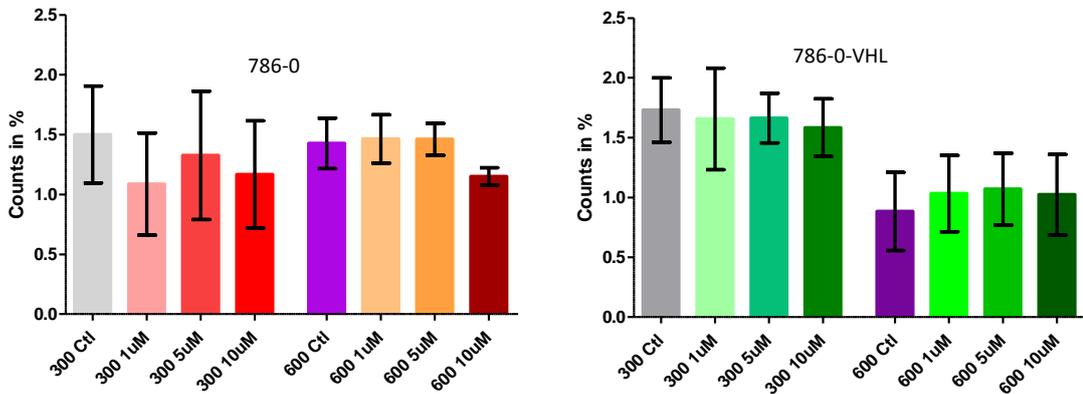


Abb. 28: Einfluss von Osmolarität und Sunitinib auf den Zellzyklus bei 786-0 und 786-0-VHL Sub G1 Phase. Zu sehen sind die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die prozentualen Anteile an gezählten Zellen in einer jeweiligen Phase des Zellzyklus (Sub G1 Phase) unter Einfluss von Sunitinib der Konzentrationen 1µM, 5µM und 10µM, sowie verschiedenen Osmolaritäten (300mOsmol/l und 600mOsmol/l). Abgebildet sind Daten aus drei unabhängigen Messreihen. Ctl = Kontrollen ohne Sunitinib, 1µM/5µM/10µM = Endkonzentration von Sunitinib im Medium, 300 = 300mOsmol/l, 600 = 600mOsmol/l (n=3, One-way Anova, p-Wert <0,05)

Sub G1 Phase Caki

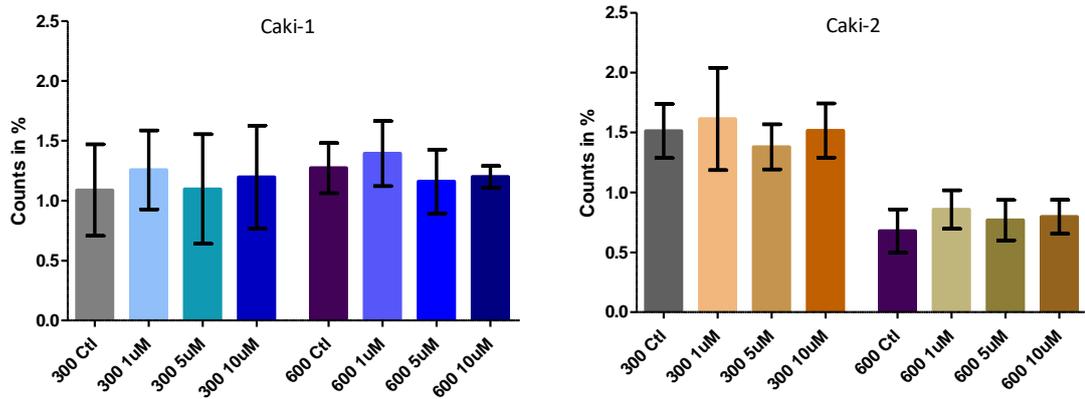


Abb. 29: Einfluss von Osmolarität und Sunitinib auf den Zellzyklus bei Caki-1 und Caki-2 Sub G1 Phase. Zu sehen sind die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die prozentualen Anteile an gezählten Zellen in einer jeweiligen Phase des Zellzyklus (Sub G1 Phase) unter Einfluss von Sunitinib der Konzentrationen 1µM, 5µM und 10µM, sowie verschiedenen Osmolaritäten (300mOsmol/l und 600mOsmol/l). Abgebildet sind Daten aus drei unabhängigen Messreihen. Ctl = Kontrollen ohne Sunitinib, 1µM/5µM/10µM = Endkonzentration von Sunitinib im Medium, 300 = 300mOsmol/l, 600 = 600mOsmol/l (n>3, One-way Anova, p-Wert <0,05)

4.4 Einfluss von Sunitinib und TSA auf die Proliferation

Abgesehen von Genmutationen spielt die Epigenetik eine weitere wichtige Rolle für die Entstehung von Karzinomen. Aufgrund epigenetischer Prozesse kann die Genexpression reguliert werden. Die Histon-Deacetylase Trichostatin A (TSA) beispielsweise blockiert reversibel Histon-Deacetylasen. Auf diese Weise kommt es zur Hyperacetylierung von Histonen und einer veränderten Chromatinstruktur. Histon-Deacetylase-Inhibitoren stellen einen Induktor des Zellarrests und der Apoptose dar, modulieren die Immunantwort und bewirken eine Reduktion der Angiogenese. Zu den Proteinen, auf deren Expression Histon-Deacetylase-Inhibitoren Einfluss nehmen, zählen unter anderem p53, HIF-1 α , VEGF oder NF- κ B, welche auch im Zusammenhang mit einer VHL-Mutation eine wichtige Rolle spielen (Eckschlager, Plch, Stiborova, & Hrabeta, 2017). Eine zusätzliche Gabe von TSA könnte somit einen zusätzlichen Effekt auf die Proliferation der Zellen zeigen.

Im Folgenden sind Proliferationsassays zu sehen, bei denen der Einfluss von TSA einzeln auf Caki-1, Caki-1, 786-0 und 786-0-VHL Zellen und in Kombination mit Sunitinib untersucht wurde. Des Weiteren wurde der Versuch unter niedrigen (300mOsmol/l) und hohen (600mOsmol/l) osmolaren Bedingungen durchgeführt. In Abbildung 30 und 31 ist zu sehen, dass TSA allein grundsätzlich keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen hat. Es zeigt sich kein Unterschied zwischen hoher und niedriger Konzentration von TSA. Insbesondere unter erhöhten Osmolaritäten scheint die Proliferation sogar zu steigen. Die niedrige Konzentration TSA ist bei Caki-1 600mOsmol/l zum Beispiel um 26,5% höher als bei Caki-1 300mOsmol/l. Diese Werte sind allerdings nicht signifikant.

Zu beobachten ist ein – in den meisten Fällen signifikanter - Rückgang der Proliferation, wenn man die hohe Konzentration TSA mit Sunitinib kombiniert (siehe Abbildung 30 und 31). Auffällig ist, dass auch hier eine erhöhte Osmolarität in den meisten Fällen nicht zu einem Abfall der Proliferation führt. Im Gegenteil steigt bei Caki-1 und auch bei den beiden 786-0 Zelllinien die Proliferation bei hoher Osmolarität und hoher Sunitinib-Konzentration deutlich an.

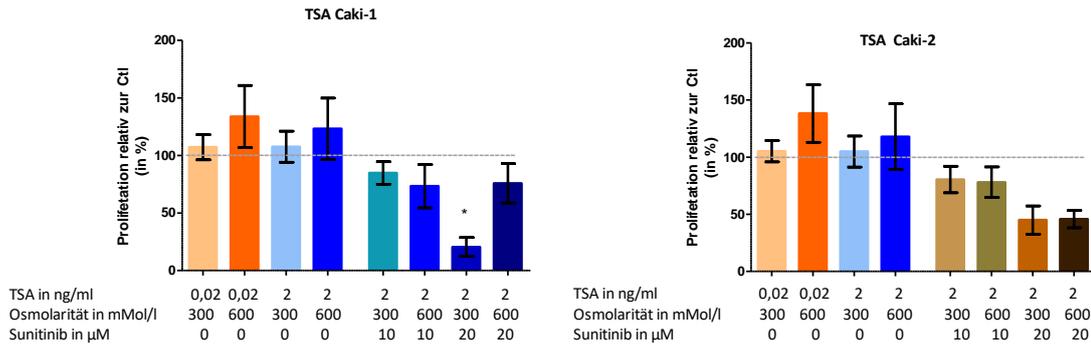


Abb. 30: Einfluss von TSA allein und TSA/Sunitinib auf die Proliferation bei Caki-1 und Caki-2. Zu sehen ist die Proliferation in Relation zur Kontrolle unter Einfluss erhöhter Sunitinib-Konzentration (10 μ M und 20 μ M), der Osmolarität (300mOsmol/l und 600mOsmol/l) und TSA (0,02ng/ml und 2ng/ml). Abgebildet sind Proliferationsassays aus vier unabhängigen Messreihen in Doppelbestimmung mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden. Im Folgenden wurden die Mittelwerte bestimmt, diese Werte dann auf die jeweiligen unbehandelten Kontrollen relativiert (Caki-1 / Caki-2 300mOsmol/l / 600mOsmol/l). * = signifikant zur Kontrolle 100% (n=4, One-way Anova, p-Wert <0,05)

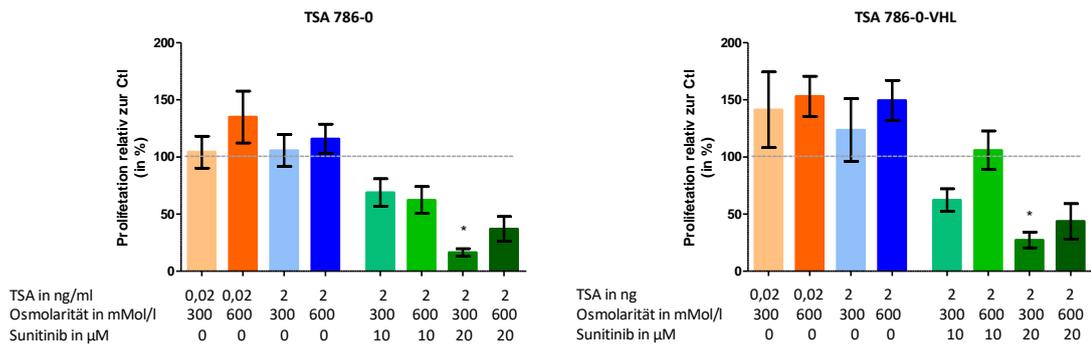


Abb. 31: Einfluss von TSA allein und TSA/Sunitinib auf die Proliferation bei 786-0 und 786-0-VHL. Zu sehen ist die Proliferation in Relation zur Kontrolle unter Einfluss erhöhter Sunitinib-Konzentration (10 μ M und 20 μ M), der Osmolarität (300mOsmol/l und 600mOsmol/l) und TSA (20pg/ml und 2ng/ml). Abgebildet sind Proliferationsassays aus vier unabhängigen Messreihen in Doppelbestimmung mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden. Im Folgenden wurden die Mittelwerte bestimmt, diese Werte dann auf die jeweiligen unbehandelten Kontrollen relativiert (VHL- / VHL+ 300mOsmol/l / 600mOsmol/l). * = signifikant zur Kontrolle 100% (n=>4, One-way Anova, p-Wert <0,05)

In den folgenden Abbildungen wurde eine kombinierte Gabe von Sunitinib und TSA mit der alleinigen Sunitinib-Gabe verglichen. Für die Caki Zelllinien (siehe Abbildung 32) lässt sich hier keine erhöhte Wirksamkeit für eine Kombinationsgabe im Vergleich zu einer alleinigen Gabe von Sunitinib erkennen. Dies lässt vermuten, dass der Effekt der erniedrigten Proliferation auf das Sunitinib zurückzuführen ist.

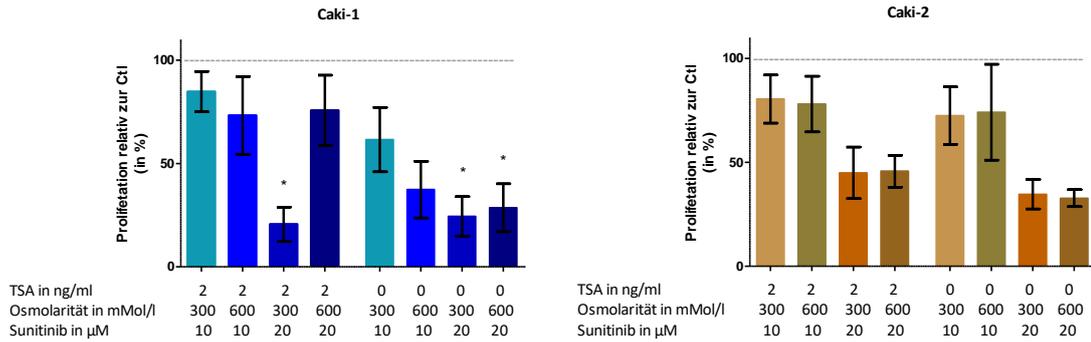


Abb. 32: Einfluss von Sunitinib allein und TSA/Sunitinib auf die Proliferation bei Caki-1 und Caki-2. Zu sehen ist die Proliferation in Relation zur Kontrolle unter Einfluss erhöhter Sunitinib-Konzentration (10 μ M und 20 μ M), der Osmolarität (300mOsmol/l und 600mOsmol/l) und TSA (20pg/ml und 2ng/ml). Abgebildet sind Proliferationsassays aus vier unabhängigen Messreihen in Doppelbestimmung mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden. Im Folgenden wurden die Mittelwerte bestimmt, diese Werte dann auf die jeweiligen unbehandelten Kontrollen (300mOsmol/l / 600mOsmol/l) relativiert, * = signifikant zur Kontrolle 100% (n=4, One-way Anova, p-Wert <0,05)

Bei den 786-0 Zelllinien (siehe Abbildung 33) erkennt man ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied. Lediglich bei niedriger Osmolarität ist die Proliferation bei einer Kombinationsgabe niedriger, als bei alleiniger Sunitinib-Gabe. Unter erhöhten Osmolaritäten zeigt sich dieser Effekt nicht mehr.

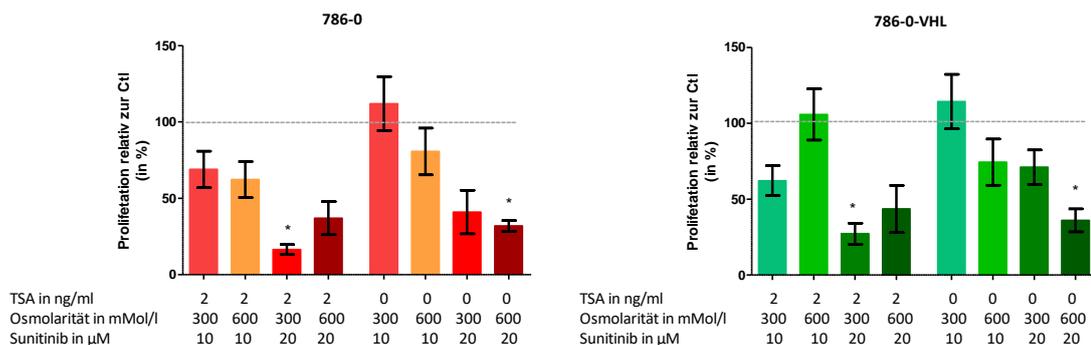


Abb. 33: Einfluss von Sunitinib allein und TSA/Sunitinib auf die Proliferation bei 786-0 und 786-0-VHL. Zu sehen ist die Proliferation in Relation zur Kontrolle unter Einfluss erhöhter Sunitinib-Konzentration (10 μ M und 20 μ M), der Osmolarität (300mOsmol/l und 600mOsmol/l) und TSA (20pg/ml und 2ng/ml). Abgebildet sind Proliferationsassays aus vier unabhängigen Messreihen in Doppelbestimmung mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden. Im Folgenden wurden die Mittelwerte bestimmt, diese Werte dann auf die jeweiligen unbehandelten Kontrollen relativiert (VHL- / VHL+). * = signifikant zur Kontrolle 100% (n=4, One-way Anova, p-Wert <0,05)

Daraus lässt sich schließen, dass TSA allein keinen Einfluss auf die Wachstumsrate der Zellen hat, sondern höchstens in Kombination mit Sunitinib eine wachstumshemmende Wirkung aufweist. Dieser Effekt ist allerdings nicht in einem signifikanten Ausmaß und nur bei niedriger Osmolarität zu erkennen.

5. Diskussion

5.1 Einfluss von Osmolarität und Sunitinib auf die Proliferation

Osmolarität stellt einen Stressfaktor für Zellen dar. Sie nimmt Einfluss auf verschiedene Prozesse in der Zelle, wie beispielsweise eine Reduktion von Transkription und Translation, DNA-Schäden und einen Zellzyklusarrest. In vitro reagieren Zellen schon auf weitaus geringere Osmolaritäten als in vivo. Eine Ursache dafür stellt die höhere Proliferation in Zellkulturen im Vergleich zur Proliferation in vivo dar. Außerdem wird die Osmolarität in vitro oft abrupter erhöht, als in vivo, wodurch sich die Zellen weniger adäquat an die erhöhte Osmolarität adaptieren können (M. B. Burg et al., 2007).

Die Zellen in den Proliferationsassays dieser Arbeit zeigten einen deutlichen Rückgang unter Osmolaritäten von 600mOsmol/l.

Groß et al. konnten in ihrer Arbeit ebenfalls eine Abhängigkeit der Proliferation von der Osmolarität darstellen. In ihrer Arbeit benutzten sie verschiedene Zelllinien. Während die murine Zelllinie mpkCCD aus dem Sammelrohr bei einer VHL-Defizienz eine niedrigere Zellteilungsrate und somit eine geringere Proliferation aufwies als bei VHL-Expression, zeigte die Zelllinie 786-0 (proximaler Tubulus) zwar ebenfalls einen Rückgang der Proliferation unter hohen Osmolaritäten, aber keinen Zusammenhang mit der Expression von VHL.

Man könnte eine erhöhte Sensitivität im Hinblick auf die Proliferation bei den VHL-defizienten Zellen für die Osmolarität erwarten. Die Ergebnisse von Groß et al. decken sich aber mit den Ergebnissen dieser Arbeit, in der sich kein Unterschied zwischen 786-0 und 786-0-VHL zeigte.

In dieser Arbeit konnte außerdem eine verminderte Proliferation unter erhöhter Osmolarität bei den Zelllinien Caki-1 und Caki-2 nachgewiesen werden. Hier zeigte Caki-2 allerdings einen deutlich geringeren Rückgang als die anderen Zelllinien. Es wären weitere Versuche notwendig, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Anpassungsfähigkeit der Zellen an erhöhte Osmolaritäten und der unterschiedlichen Expression von VEGF und HIF-2 α der verschiedenen Zelllinien zu untersuchen.

Diese Ergebnisse zeigen die Abhängigkeit des VHL-Gens von der Osmolarität hinsichtlich der Proliferation also nur teilweise, decken sich aber mit der Studie von Groß et al.

In einem nächsten Schritt wurde der Einfluss von Sunitinib auf die verschiedenen Zelllinien untersucht. Hier zeigte sich für alle Zelllinien eine Abnahme der Proliferation unter Konzentrationen ab 10 μ m Sunitinib, allerdings nur bei den Caki Zellen in einem statistisch signifikanten Maß. Diese reagierten insgesamt sensibler auf Sunitinib, als die 786-0 Zelllinien.

Gao et al. zeigten in ihrer Arbeit ebenfalls einen Effekt von Sunitinib auf die Zellen von Caki-1 und 786-0 (VHL Wildtyp). In ihrer Arbeit reagierten allerdings die 786-0 Zellen sensibler als die Caki-1 Zellen. Zudem zeigten sich Effekte schon bei weitaus geringeren Konzentrationen von Sunitinib (1-8 μ M) bei einer Inkubationszeit von 48h (Gao, Jiang, Han, Peng, & Wang, 2015). Allerdings wurden in diesem Versuch mehr Zellen pro Kavität ausgesät (5x10³ im Gegensatz zu 5x10²), welches gegebenenfalls zu erhöhtem Stress der Zellen und somit auch zu einer erhöhten Sensibilität auf Sunitinib geführt haben kann.

Anders bei Mizumoto et al., hier konnte wiederum eine geringere Sensitivität für 786-0 (ebenfalls VHL Wildtyp) im Vergleich zu Caki-1 Zellen nachweisen werden. Es zeigte sich außerdem ein Anstieg der Proliferation bei niedrigen Konzentrationen von Sunitinib (1 μ m) über 100% (Mizumoto et al., 2015), ein Effekt, der auch in dieser Arbeit beobachtet wurde.

In beiden Arbeiten handelt es sich bei der verwendeten 786-0 Zelllinie allerdings, wie bereits oben erwähnt und anders als in dieser Arbeit, um Zelllinien mit VHL-Wildtyp, sodass die beschriebenen Effekte zwischen den Zelllinien Caki und 786-0 wahrscheinlich auf andere Faktoren, als die Expression von pVHL zurückzuführen sind.

Des Weiteren wurde der Effekt einer kombinierten Gabe von Sunitinib und erhöhter Osmolarität auf die Zellen untersucht. Dies könnte beispielsweise einer Resistenzentwicklung entgegenwirken, da möglicherweise eine Dosisreduktion von Sunitinib bei erhöhten Osmolaritäten mit gleichem Effekt möglich sein könnte (siehe 6,4). Die Versuche zeigen aber, dass eine erhöhte Osmolarität die Zellen des Nierenzellkarzinoms nicht sensibler macht für eine Sunitinib-Gabe. Es zeigt sich sogar eine Erhöhung der Proliferation bei nur niedrigen Konzentrationen von Sunitinib (1 μ m). Dieser Effekt ist allerdings auch in anderen Studien zu beobachten, wie beispielsweise bei Mizumoto et al. (Mizumoto et al., 2015). Betrachtet man die Wachstumsraten, so ist kein zusätzlicher Effekt zu erkennen. Beziehungsweise geht die Proliferation bei den 786-0-VHL Zellen bei einer Kombination sogar weniger stark zurück als bei der einzelnen Gabe von sowohl Sunitinib oder auch lediglich erhöhter Osmolarität. Dies würde für einen protektiven Effekt einer kombinierten Gabe sprechen.

Hinsichtlich der Frage, ob eine niedrigere Konzentration von Sunitinib bei hoher Osmolarität einen ähnlichen Effekt hervorruft wie eine hohe Sunitinib-Konzentration bei niedriger Osmolarität, betrachtet man den Unterschied zwischen 10 μ m 600mOsmol/l und 20 μ m 300mOsmol/l. Dies könnte die Möglichkeit einer Dosisreduktion mit sich bringen. In allen Fällen ist eine im Vergleich höhere Proliferation bei den Zellen mit einer Behandlung von 10 μ m 600mOsmol/l zu sehen. Es zeigt sich zwar kein statistisch relevanter Unterschied, allerdings eine

deutliche Tendenz, die gegen die These spricht, dass die Sunitinib-Dosis bei höherer Osmolarität verringert werden könnte.

Interessant ist, dass die Proliferation der 786-0-VHL, beziehungsweise Caki-2 Zellen bei längerer Inkubationsdauer unter die Proliferation der 786-0 beziehungsweise Caki-1 Zellen sinkt. Dies könnte möglicherweise auf Resistenzentwicklungen zurückzuführen sein, die eine große Rolle bei der Therapie mit Sunitinib spielen (siehe Kapitel 5.4).

5.2 Einfluss von Sunitinib und Osmolarität auf die tumorbildenden Eigenschaften

Wie bereits in Kapitel 5.1. erläutert, wirkt sich die Osmolarität auf die Proliferation von Zellen aus. Auch hinsichtlich der tumorbildenden Eigenschaften zeigen sich Effekte. Signifikant reagiert die Koloniezahl der 786-0-VHL und Caki-2 Zellen auf eine erhöhte Osmolarität. Die Caki-1 Zellen zeigen nur einen geringen Rückgang der Koloniezahl. Ein signifikanter Unterschied zwischen 786-0-VHL und 786-0 unter hoher Osmolarität zeigt sich nicht.

Allerdings lässt sich generell eine niedrigere Koloniezahl bei den 786-0 im Vergleich zu den 786-0-VHL Zellen darstellen, auch wenn ein gegenteiliger Effekt zu erwarten gewesen wäre.

Generell zeigen sich in den Colony Forming Assays lediglich Effekte auf die Koloniezahl. Die Koloniegröße wird weder durch die Osmolarität, noch durch die Gabe von Sunitinib beeinflusst. Die Ergebnisse der Colony Forming Assays bestätigen die beschriebenen Effekte aus den Proliferationsassays.

Luo et al beschreiben in ihrer Arbeit die Koloniebildung von 786-0-Zellen unter Sunitinib-Einfluss. Sie konnten eine Reduktion der Koloniezahl unter erhöhter Sunitinib-Konzentration nachweisen. Allerdings zeigt sich im Vergleich zu Sunitinib-resistenten 786-0-Zellen nicht nur ein Einfluss auf die Koloniezahl, sondern auch auf die Koloniegröße (Luo et al., 2019). In dieser Arbeit erweist sich die Koloniegröße nicht abhängig von der Gabe von Sunitinib. Die Koloniezahl ist allerdings auch hier bei allen Zellen unter erhöhter Sunitinib-Gabe rückläufig. Luo et al verwendeten eine leicht erhöhte Konzentration von Sunitinib von $6\mu\text{m}$, sowie eine deutlich geringere Anzahl an Zellen pro Kavität. Dies könnte ein Ansprechen der Tumorgröße auf Sunitinib erklären. Möglicherweise ist auch eine längere Inkubationszeit notwendig, um Unterschiede in der Koloniegröße erkennen zu können.

In dieser Arbeit zeigen sich zudem stärkere Effekte bei den Caki Zellen als bei den 786-0 Zelllinien. Zwischen Caki-1 und Caki-2 sind keine Unterschiede erkennbar. Bei den 786-0 Zelllinien ist die Tendenz zu einer erhöhten Sensibilität auf Sunitinib bei den VHL-defizienten im Vergleich zu den 786-0-VHL Zellen erkennbar, allerdings ohne Signifikanz.

Insbesondere die Caki Zellen scheinen im Colony Forming Assay sensibler auf die Gabe von Sunitinib zu reagieren als im Proliferationsassay. Dies bestätigt eine Arbeit von Vandersickel et

al., in welcher Wachstumskurven bei Proliferationsassays deutlicher flacher ausfallen als bei Colony Forming Assays (Vandersickel, Slabbert, Thierens, & Vral, 2011).

Analog zu den Proliferationsassays zeigte auch hier eine kombinierte Gabe von hoher Osmolarität und hoher Sunitinib-Konzentration keinen zusätzlich signifikanten Effekt. Betrachtet man die Wachstumsraten, zeigt sich im Colony Forming Assay lediglich bei den 786-0 Zellen die Tendenz einer erhöhten Sensibilität für Sunitinib bei höherer Osmolarität. Es zeigten sich ca. 30 Kolonien weniger als bei einer alleinigen Erhöhung der Osmolarität.

5.3 Einfluss von Sunitinib und Osmolarität auf den Zellzyklus

Gao et al. untersuchten unter anderem den Einfluss von Sunitinib auf den Zellzyklus. Sie konnten einen Sunitinib induzierten Zellzyklusarrest nachweisen mit einem Übertritt der Zellen in die G0/1 Phase, allerdings bei einer Konzentration von 4µm nicht in einem statistisch signifikanten Maß (Gao et al., 2015). Auch Korashy et al. untersuchten in ihrer Arbeit den Einfluss und die Wirkweise von Sunitinib auf den Zellzyklus, allerdings auf Zellen des Mamma-Karzinoms. Sie kamen zu dem Schluss, dass eine verminderte Proliferation auf einen Zellzyklusarrest, die Induktion der Apoptose und die Aktivierung von oxidativem Stress regulierenden Signalwegen zurückzuführen ist. (Korashy et al., 2017).

Die in Kapitel 4.3 erläuterte Analyse des Zellzyklus in dieser Arbeit ergab, dass unter dem Einfluss von Sunitinib unter einer Konzentration von 10µm alle untersuchten Zellen vermehrt von der G2/M in die G0/1 Phase übertraten, aber nur die VHL-defizienten Zellen mit einer statistischen Signifikanz. Es zeigte sich zudem eine Zunahme der Apoptose (bzw. ein vermehrter Übergang in die Sub G1 Phase). Weiterführende Versuche auf mRNA- und Proteinebene hinsichtlich Zellzyklus assoziierter Gene wären wichtig. Beispielsweise Cyclin D1, welches bei Karzinomen mit VHL-Mutation vermehrt exprimiert wird (Atkins et al., 2005). Korashi et al. konnten eine Herunterregulierung von Cyclin D1 unter Sunitinib bei Zellen des Mammakarzinoms beobachten (Korashy et al., 2017).

Es kommt also zu einer verminderten Zellteilung, beziehungsweise verweilen die Zellen sogar in einem Zellarrest (G0). Die Gabe von Sunitinib bei Zellen mit verminderter Expression von pVHL scheint somit die Zellteilung zu verlangsamen. Dieser Effekt zeigt sich aber nur bei geringem osmotischem Stress. Unter hohen Osmolaritäten zeigt sich kein Effekt auf die Zellen, die mit Sunitinib behandelt wurden. Die Wirkung von Sunitinib auf den Zellzyklus scheint aufgehoben zu sein.

Studien zeigen hingegen, dass eine akut erhöhte Osmolarität durchaus einen Zellzyklusarrest hervorruft (M. B. Burg et al., 2007). Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen waren allerdings an hohe Osmolaritäten adaptiert. Laut Michea et al. prädominiert bei chronisch adaptierten Zellen

die G0/G1 Phase (Michea et al., 2000), ein Effekt, der in dieser Arbeit nachzuvollziehen ist. Allerdings ist der Unterschied zwischen 300mOsmol/l und 600mOsmol/l in dieser Arbeit nicht signifikant. Ein additiver Nutzen von hoher Osmolarität und Sunitinib ist also auch auf Zellzyklusebene nicht nachzuweisen.

5.4 Einfluss von Sunitinib und TSA auf die Proliferation

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Therapie des Nierenzellkarzinoms ist die Entstehung von Resistenzen gegen die jeweiligen Therapeutika, wie beispielsweise Tyrosinkinaseinhibitoren. Im Fall von Sunitinib weisen ca. 30% aller PatientInnen eine primäre Resistenz gegen den Wirkstoff auf (Heng et al., 2012). Von den verbliebenen 70% entwickeln fast alle eine Resistenz innerhalb von 6 – 15 Monaten (Rini & Atkins, 2009). Die aktuelle Leitlinie empfiehlt nach Entstehung einer Resistenz gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren ein Umsteigen der Therapie auf mTOR-Inhibitoren oder Checkpointinhibitoren: z.B. Nivolumab, Cabozantinib oder Lenvatinib + Everolimus ("Kurzversion S3-Leitlinie Nierenzellkarzinom," August 2020).

Andere experimentelle Ansätze stellen die kombinierte Gabe mit anderen Substanzen dar, z.B. mit dem mTOR-Inhibitor Temsirolimus (Makhov et al., 2012), Tocilizumab - einem Monoklonalen Antikörper gegen IL-6 (Interleukin-6) - oder Enzalutamid - ein Androgenrezeptor-Inhibitor (Adelaiye-Ogala et al., 2018). Diese Kombinationstherapien gehen allerdings oft mit einer erhöhten Toxizität einher (Kamli et al., 2022).

Ein weiterer Ansatz ist die Kombination von Tyrosinkinaseinhibitoren mit Histon-Deacetylase-Inhibitoren. Histon-Deacetylasen wirken sich beim Nierenzellkarzinom beispielsweise auf die Metastasenbildung, Zellinvasion und -migration aus. Auch die HIF-1 α Expression wird durch Acetylierung wesentlich beeinflusst (Wawruszak et al., 2019).

Kim et al. untersuchten in ihrer Arbeit den synergistischen Effekt von Sorafenib (ein Tyrosinkinaseinhibitor) und dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Belinostat und konnten deutliche Effekte bei verschiedenen Zelllinien des Nierenzellkarzinoms zeigen (z.B. Caki-1 und 786-O-VHL), unabhängig von der VHL-Expression (Kim et al., 2012).

Rausch et al. konnten zeigen, dass sich eine Kombinationsbehandlung mit zwei verschiedenen Histon-Deacetylase-Inhibitoren und einem Tyrosinkinaseinhibitor auf die Migration und die Apoptose von Caki-1 Zellen auswirkt und auch bei Sunitinib-resistenten Zellen einen Effekt aufweist (Rausch et al., 2020). In ihrer Arbeit benutzen sie allerdings weder das in dieser Arbeit verwendete TSA (Trichostatin-A), noch Sunitinib.

In dieser Arbeit wurden Sunitinib und TSA in Kombination untersucht, allerdings zeigte sich hier kein Effekt. Möglicherweise ist die erhöhte Proliferation bei niedrigen Sunitinib-

Konzentrationen von 1µM auf über 100% auf eine Resistenzentwicklung zurückzuführen. Bei höheren Sunitinib-Konzentrationen wurden allerdings auch keine Resistenzen induziert.

Sato et al. untersuchten in Ihrer Arbeit ebenfalls den Einfluss von Sunitinib und TSA auf 786-O, Caki-1 und ACHN Zellen (Human Kidney Adenocarcinoma Zelllinie) und konnten einen deutlichen Effekt nachweisen, welcher auf eine erhöhte Aktivität von p53 zurückzuführen sei (Sato et al., 2019).

Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit wie gesagt nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse waren nicht signifikant, auch wenn eine Tendenz hinsichtlich einer Kombinationsgabe bei den 786-O-Zelllinien erkennbar war. Ein alleiniger Effekt von TSA konnte nicht gezeigt werden. Die Osmolarität schien hierbei eher einen protektiven Einfluss auf die Zellen zu haben. Allerdings wurden bei Sato et al. weitaus höhere Konzentrationen TSA verwendet als in dieser Arbeit (250nM gegenüber einer maximalen Konzentration 2ng/ml in dieser Arbeit, was etwa 6,61nM entspricht). Der Hersteller empfiehlt eine Dosis von ungefähr 10nM, dies liegt gering über der in dieser Arbeit verwendeten Dosis, aber deutlich unter der bei Sato et al. verwendeten Konzentration. Zudem erfolgte bei Sato et al. eine längere Inkubation von 48 Stunden im Vergleich zu lediglich 24 Stunden in dieser Arbeit. In einem nachfolgenden Versuch könnte die Inkubationsdauer ggf. verlängert werden, der Hersteller empfiehlt sogar 96 Stunden. Weitere mögliche Versuchsansätze wären die Verwendung eines anderen Histon-Deacetylase-Inhibitors, wie beispielsweise das in der Arbeit von Kim et al. verwendete Belinostat oder die Behandlung von bereits resistenten Zelllinien mit Sunitinib und einem Histon-Deacetylase-Inhibitor.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit ein kombinierter Effekt von Sunitinib und Osmolarität nicht gezeigt werden konnte. Die genauen Ursachen bedürfen weiterer Forschung. Einen Erklärungsansatz bietet möglicherweise die Arbeit von Gentile et al., in der eine erhöhte Osmolarität die Expression von VEGF begünstigt (Gentile et al., 2011). Somit steht einer Hemmung von Tyrosinkinasen, u.a. des VEGF-Rezeptors, eine erhöhte Konzentration des Wachstumsfaktors VEGF gegenüber.

Denkbar wäre zudem, dass in vivo andere Wirkmechanismen eine Rolle spielen als bei einer Anwendung von Sunitinib in vitro. In vivo beruht der Haupteffekt von Sunitinib auf einer Hemmung der Angiogenese, in vitro eher auf der Apoptose.

6. Zusammenfassung

Groß et al zeigten, dass Nierenzellen auf hohe Osmolaritäten mit einer gesteigerten Expression von Osmose-abhängigen Genen reagieren. In diesem Abschnitt der Niere können physiologischerweise stark erhöhte Osmolaritäten herrschen, um eine Harnkonzentrierung zu erreichen. Dieser Regulationsmechanismus ist bei einer Deletion des VHL-Gens gestört, da das Genexpressionsmuster bei Hyperosmolarität invers reguliert wird. Für die Zelle protektive Gene, die unter hohen Osmolaritäten vermehrt exprimiert werden, sind bei einer Mutation des VHL-Gens herunterreguliert (Groß et al., 2020). Daraus ließe sich eine erhöhte Anfälligkeit von Zellen mit einer VHL-Defizienz auf die Osmolarität ableiten.

Der Wirkmechanismus von Sunitinib beruht unter anderem auf einer Inhibition der VEGF- und PDGF-Rezeptoren, welche bei Zellen mit VHL-Mutation, aber auch in den Caki-1 Zellen vermehrt vorliegen. In dieser Arbeit wurde eingangs die Hypothese aufgestellt, dass eine erhöhte Osmolarität die Wirkung des Tyrosinkinaseinhibitors Sunitinib verstärkt.

Diese Hypothese konnte auf Grundlage der durchgeführten Versuchsreihen nicht bestätigt werden.

Es konnte allerdings die proliferationshemmende Wirkung von Sunitinib und Osmolarität gesondert auf Zellen des Nierenzellkarzinoms bestätigt werden. Ähnliche Effekte ließen sich mit dem Colony Forming Assay darstellen, wo sowohl erhöhte Sunitinib-Konzentration wie auch eine erhöhte Osmolarität zu einer verminderten Koloniebildung führte. Auch der stabilisierende Einfluss von Sunitinib auf den Zellzyklus mit einem vermehrten Übertritt der Zellen in die G0/1 Phase konnte gezeigt werden. Die Osmolarität hatte hier keinen Einfluss auf den Zellzyklus.

Eine Kombination mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor TSA, der beispielsweise in Versuchsreihen zur Erforschung der Resistenzentwicklung unter Sunitinib verwendet wird, zeigte hingegen ebenfalls keinen zusätzlichen Effekt auf die Proliferation der Zellen.

Insgesamt zeigt sich keine Wirkungsverstärkung bei einer kombinierten Gabe von hoher Sunitinib-Konzentration und hoher Osmolarität. Eine Dosisreduktion von Sunitinib unter erhöhten Osmolaritäten, ein möglicher neuer Therapieansatz, scheint somit nicht sinnvoll.

Literaturverzeichnis

- Adelaiye-Ogala, R., Damayanti, N. P., Orillion, A. R., Arisa, S., Chintala, S., Titus, M. A., . . . Pili, R. (2018). Therapeutic Targeting of Sunitinib-Induced AR Phosphorylation in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res*, *78*(11), 2886-2896. doi:10.1158/0008-5472.Can-17-3386
- Atkins, D. J., Gingert, C., Justenhoven, C., Schmahl, G. E., Bonato, M. S., Brauch, H., & Störkel, S. (2005). Concomitant deregulation of HIF1alpha and cell cycle proteins in VHL-mutated renal cell carcinomas. *Virchows Arch*, *447*(3), 634-642. doi:10.1007/s00428-005-1262-y
- Behrends, J. C., Josef Bischofsberger, Rainer Deutzmann, Heimo Ehmke, Stephan Frings, Stephan Grissmer, Markus Hoth, Armin Kurtz, Jens Leipziger, Frank Müller, Claudia Pedain, Jens Rettig, Charlotte Wagner, Erhard Wischmeyer. (2017). *Physiologie* (3 ed. Vol. 3. Auflage). Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Bianchi, L., Rossi, L., Tomao, F., Papa, A., Zoratto, F., & Tomao, S. (2013). Thyroid dysfunction and tyrosine kinase inhibitors in renal cell carcinoma. *Endocr Relat Cancer*, *20*(5), R233-245. doi:10.1530/erc-13-0201
- Bogusławska, J., Popławski, P., Alseekh, S., Koblowska, M., Iwanicka-Nowicka, R., Rybicka, B., . . . Piekietko-Witkowska, A. (2019). MicroRNA-Mediated Metabolic Reprograming in Renal Cancer. *Cancers (Basel)*, *11*(12). doi:10.3390/cancers11121825
- Brugarolas, J. (2007). Renal-cell carcinoma--molecular pathways and therapies. *N Engl J Med*, *356*(2), 185-187. doi:10.1056/NEJMe068263
- Buentig, N., Storkel, S., & Atzpodien, J. (2002). [Molecular genetic changes in renal cell carcinomas]. *Urologe A*, *41*(5), 475-481.
- Burg, M. B., Ferraris, J. D., & Dmitrieva, N. I. (2007). Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev*, *87*(4), 1441-1474. doi:10.1152/physrev.00056.2006
- Burg, M. B., Kwon, E. D., & Kültz, D. . (1996). Osmotic regulation of gene expression. . *The FASEB Journal*, *10*(14), 1598-1606.

- Clark, P. E. (2009). The role of VHL in clear-cell renal cell carcinoma and its relation to targeted therapy. *Kidney Int*, 76(9), 939-945. doi:10.1038/ki.2009.296
- Cockman, M. E., Masson, N., Mole, D. R., Jaakkola, P., Chang, G. W., Clifford, S. C., . . . Maxwell, P. H. (2000). Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem*, 275(33), 25733-25741. doi:10.1074/jbc.M002740200
- Diori Karidio, I., & Sanlier, S. H. (2021). Reviewing cancer's biology: an eclectic approach. *J Egypt Natl Canc Inst*, 33(1), 32. doi:10.1186/s43046-021-00088-y
- Drake, J. M., Lee, J. K., & Witte, O. N. (2014). Clinical targeting of mutated and wild-type protein tyrosine kinases in cancer. *Mol Cell Biol*, 34(10), 1722-1732. doi:10.1128/mcb.01592-13
- Eckschlager, T., Plch, J., Stiborova, M., & Hrabeta, J. (2017). Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *Int J Mol Sci*, 18(7). doi:10.3390/ijms18071414
- Faivre, S., Delbaldo, C., Vera, K., Robert, C., Lozahic, S., Lassau, N., . . . Raymond, E. (2006). Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol*, 24(1), 25-35. doi:10.1200/jco.2005.02.2194
- Faivre, S., Demetri, G., Sargent, W., & Raymond, E. (2007). Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(9), 734-745. doi:10.1038/nrd2380
- Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*, 1(5), 2315-2319. doi:10.1038/nprot.2006.339
- Friedrich, P. D. D. O. (2007). *Physiologie* (1 ed.). Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Ganten, P. D. D., Prof. Dr. Klaus Ruckpaul. (1998). *Tumor-Erkrankungen* (1 ed.): Springer-Verlag.

- Gao, H., Jiang, Q., Han, Y., Peng, J., & Wang, C. (2015). Hispidulin potentiates the antitumor effect of sunitinib against human renal cell carcinoma in laboratory models. *Cell Biochem Biophys*, 71(2), 757-764. doi:10.1007/s12013-014-0260-6
- Gentile, L. B., Piva, B., & Diaz, B. L. (2011). Hypertonic stress induces VEGF production in human colon cancer cell line Caco-2: inhibitory role of autocrine PGE₂. *PLoS One*, 6(9), e25193. doi:10.1371/journal.pone.0025193
- Groß, A., Chernyakov, D., Gallwitz, L., Bornkessel, N., & Edemir, B. (2020). Deletion of Von Hippel-Lindau Interferes with Hyper Osmolality Induced Gene Expression and Induces an Unfavorable Gene Expression Pattern. *Cancers (Basel)*, 12(2). doi:10.3390/cancers12020420
- Hacker, D. S. D. M. H. H. C. H. S. D. (2019). *Purves Biologie* (10. Auflage ed.). Springer Spektrum, Berlin.
- Heng, D. Y., Mackenzie, M. J., Vaishampayan, U. N., Bjarnason, G. A., Knox, J. J., Tan, M. H., . . . Choueiri, T. K. (2012). Primary anti-vascular endothelial growth factor (VEGF)-refractory metastatic renal cell carcinoma: clinical characteristics, risk factors, and subsequent therapy. *Ann Oncol*, 23(6), 1549-1555. doi:10.1093/annonc/mdr533
- Hesketh, R. (1995). *The Oncogene Facts Book* (1 ed.). London: Academic Press Limited.
- Kaelin, W. G., Jr. (2017). The VHL Tumor Suppressor Gene: Insights into Oxygen Sensing and Cancer. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 128, 298-307.
- Kamli, H., Glenda, G. C., Li, L., Vesey, D. A., & Morais, C. (2018). Characterisation of the Morphological, Functional and Molecular Changes in Sunitinib-Resistant Renal Cell Carcinoma Cells. *J Kidney Cancer VHL*, 5(3), 1-9. doi:10.15586/jkcvhl.2018.106
- Kamli, H., Owens, E. P., Vesey, D. A., Prasanna, R., Li, L., Gobe, G. C., & Morais, C. (2022). Overcoming sunitinib resistance with tocilizumab in renal cell carcinoma: Discordance between in vitro and in vivo effects. *Biochem Biophys Res Commun*, 586, 42-48. doi:10.1016/j.bbrc.2021.11.069

- Kandabarau, S., Leiz, J., Krohn, K., Winter, S., Bedke, J., Schwab, M., . . . Edemir, B. (2019). Hypertonicity-Affected Genes Are Differentially Expressed in Clear Cell Renal Cell Carcinoma and Correlate with Cancer-Specific Survival. *Cancers (Basel)*, *12*(1). doi:10.3390/cancers12010006
- Kim, M. J., Kim, D. E., Jeong, I. G., Choi, J., Jang, S., Lee, J. H., . . . Kim, C. S. (2012). HDAC inhibitors synergize antiproliferative effect of sorafenib in renal cell carcinoma cells. *Anticancer Res*, *32*(8), 3161-3168.
- Korashy, H. M., Maayah, Z. H., Al Anazi, F. E., Alsaad, A. M., Alanazi, I. O., Belali, O. M., . . . Alshamsan, A. (2017). Sunitinib Inhibits Breast Cancer Cell Proliferation by Inducing Apoptosis, Cell-cycle Arrest and DNA Repair While Inhibiting NF- κ B Signaling Pathways. *Anticancer Res*, *37*(9), 4899-4909. doi:10.21873/anticancerres.11899
- Kurzversion S3-Leitlinie Nierenzellkarzinom. (August 2020, August 2020). Retrieved from https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Nierenzellkarzinom/Version_2/LL_Nierenzellkarzinom_Kurzversion_2.0.pdf
- Lahti, S., Ludwig, J. M., Xing, M., Sun, L., Zeng, D., & Kim, H. S. (2017). In vitro biologic efficacy of sunitinib drug-eluting beads on human colorectal and hepatocellular carcinoma-A pilot study. *PLoS One*, *12*(4), e0174539. doi:10.1371/journal.pone.0174539
- Lapinskas, E. J., Svobodova, S., Davis, I. D., Cebon, J., Hertzog, P. J., & Pritchard, M. A. (2011). The Ets transcription factor ELF5 functions as a tumor suppressor in the kidney. *Twin Res Hum Genet*, *14*(4), 316-322. doi:10.1375/twin.14.4.316
- Liu, Y., Cox, S. R., Morita, T., & Kourembanas, S. (1995). Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res*, *77*(3), 638-643. doi:10.1161/01.res.77.3.638
- Luo, L., Liang, Y., Ding, X., Ma, X., Zhang, G., & Sun, L. (2019). Significance of cyclooxygenase-2, prostaglandin E2 and CD133 levels in sunitinib-resistant renal cell carcinoma. *Oncol Lett*, *18*(2), 1442-1450. doi:10.3892/ol.2019.10442

- Makhov, P. B., Golovine, K., Kutikov, A., Teper, E., Canter, D. J., Simhan, J., . . . Kolenko, V. M. (2012). Modulation of Akt/mTOR signaling overcomes sunitinib resistance in renal and prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther*, *11*(7), 1510-1517. doi:10.1158/1535-7163.Mct-11-0907
- Mizumoto, A., Yamamoto, K., Nakayama, Y., Takara, K., Nakagawa, T., Hirano, T., & Hirai, M. (2015). Induction of epithelial-mesenchymal transition via activation of epidermal growth factor receptor contributes to sunitinib resistance in human renal cell carcinoma cell lines. *J Pharmacol Exp Ther*, *355*(2), 152-158. doi:10.1124/jpet.115.226639
- Moch, H. (2008). [Von-Hippel-Lindau (VHL) protein function by initiation and progression of renal cancer]. *Pathologe*, *29 Suppl 2*, 149-152. doi:10.1007/s00292-008-1034-y
- Motzer, R. J., Escudier, B., Gannon, A., & Figlin, R. A. (2017). Sunitinib: Ten Years of Successful Clinical Use and Study in Advanced Renal Cell Carcinoma. *Oncologist*, *22*(1), 41-52. doi:10.1634/theoncologist.2016-0197
- Pape, H.-C., Armin Kurtz, Stefan Silbernagel (2010). *Physiologie* (6 ed.). Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Rausch, M., Weiss, A., Zoetemelk, M., Piersma, S. R., Jimenez, C. R., van Beijnum, J. R., & Nowak-Sliwinska, P. (2020). Optimized Combination of HDACI and TKI Efficiently Inhibits Metabolic Activity in Renal Cell Carcinoma and Overcomes Sunitinib Resistance. *Cancers (Basel)*, *12*(11). doi:10.3390/cancers12113172
- Rini, B. I., & Atkins, M. B. (2009). Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma. *Lancet Oncol*, *10*(10), 992-1000. doi:10.1016/s1470-2045(09)70240-2
- Roth, W., S. Macher-Göppinger, P. Schirmacher. (2011). Pathologie und molekulare Pathogenese des Nierezellkarzinoms. *Der Nephrologe*, *4*.
- Sato, H., Uzu, M., Kashiba, T., Fujiwara, T., Hatakeyama, H., Ueno, K., & Hisaka, A. (2019). Trichostatin A modulates cellular metabolism in renal cell carcinoma to enhance sunitinib sensitivity. *Eur J Pharmacol*, *847*, 143-157. doi:10.1016/j.ejphar.2019.01.040

- Schmidt, R. F. (2001). *Physiologie Kompakt* (4 ed. Vol. 4. Auflage). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Schönenberger, D., Rajski, M., Harlander, S., & Frew, I. J. (2016). Vhl deletion in renal epithelia causes HIF-1 α -dependent, HIF-2 α -independent angiogenesis and constitutive diuresis. *Oncotarget*, 7(38), 60971-60985. doi:10.18632/oncotarget.11275
- Semenza, G. L., Neufelt, M. K., Chi, S. M., & Antonarakis, S. E. (1991). Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(13), 5680-5684. doi:10.1073/pnas.88.13.5680
- Seth, A., & Watson, D. K. (2005). ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *Eur J Cancer*, 41(16), 2462-2478. doi:10.1016/j.ejca.2005.08.013
- Tello, D., Balsa, E., Acosta-Iborra, B., Fuertes-Yebra, E., Elorza, A., Ordóñez, Á., . . . Landázuri, M. O. (2011). Induction of the mitochondrial NDUFA4L2 protein by HIF-1 α decreases oxygen consumption by inhibiting Complex I activity. *Cell Metab*, 14(6), 768-779. doi:10.1016/j.cmet.2011.10.008
- Thomasova, D., & Anders, H. J. (2015). Cell cycle control in the kidney. *Nephrol Dial Transplant*, 30(10), 1622-1630. doi:10.1093/ndt/gfu395
- Vandersickel, V., Slabbert, J., Thierens, H., & Vral, A. (2011). Comparison of the colony formation and crystal violet cell proliferation assays to determine cellular radiosensitivity in a repair-deficient MCF10A cell line. *Radiation Measurements*, 46(1), 72-75.
- Wawruszak, A., Kalafut, J., Okon, E., Czapinski, J., Halasa, M., Przybyszewska, A., . . . Stepulak, A. (2019). Histone Deacetylase Inhibitors and Phenotypical Transformation of Cancer Cells. *Cancers (Basel)*, 11(2). doi:10.3390/cancers11020148
- Yu, Z., Pestell, T. G., Lisanti, M. P., & Pestell, R. G. (2012). Cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 44(12), 2144-2151. doi:10.1016/j.biocel.2012.08.022

Thesen

1. Eine kombinierte Gabe von Sunitinib und erhöhter Osmolarität auf Zellen des klarzelligen Nierenzellkarzinoms in vitro könnte einen synergistischen Effekt auf Wachstum, Koloniebildung und Zellzyklus der Zellen zeigen.
2. Die Hinzunahme des Histon-Deacetylase-Hemmers TSA, welcher die epigenetische Expression von Genen beeinflusst, könnte ebenfalls Effekte auf die Proliferation der Zellen zeigen, bzw. einer Resistenzentwicklung entgegenwirken.
3. Sowohl die Proliferation wie auch die Anzahl an gebildeten Kolonien geht unter erhöhter Sunitinib-Konzentration, ebenso wie unter erhöhter Osmolarität signifikant zurück
4. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen VHL exprimierenden und VHL defizienten Zelllinien hinsichtlich der Anfälligkeit für eine erhöhte Osmolarität oder Sunitinibgabe.
5. Die Caki-Zelllinien reagieren sensibler auf hohe Konzentrationen von Sunitinib als die 786-0 Zelllinien, sowohl hinsichtlich der Proliferation, wie auch der Anzahl an gebildeten Kolonien.
6. Unter geringem osmotischem Stress bewirkt eine hohe Konzentration von Sunitinib einen Zellzyklusarrest bei den VHL defizienten Zellen.
7. Die Erhöhung der Osmolarität bei gleichzeitiger Gabe von Sunitinib bewirkt keine additive Hemmung der Proliferation oder Koloniebildung.
8. Die Gabe von TSA hat keinen zusätzlichen signifikanten wachstumshemmenden Nutzen, weder bei alleiniger noch gleichzeitiger Gabe von Sunitinib und/oder erhöhter Osmolarität.

Selbstständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), der 17.03.2022

Carolin Walkemeyer

Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an die gesamte Arbeitsgruppe des Forschungslabors der Inneren Medizin IV, die mich so freundlich und hilfsbereit aufgenommen hat. Ganz besonders an PD Dr. rer. nat. Bayram Edemir, der mir stets äußerst kompetent, hilfsbereit und mit viel persönlichem Engagement zur Seite gestanden und mich unterstützt hat. Ebenso an Thomas Brachmann, der mir bei der täglichen Laborarbeit mit all ihren Hürden eine große Hilfe war. Weiterhin an Frau Vanessa Kirsch, Frau Dr. Christiane Kügler-Walkemeyer und meine gesamte Familie für ihre moralische Unterstützung und hilfreiche Anmerkungen.