Aus der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie (Univ.-Prof. Dr. med. G. A. Müller) der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# Die Rolle von Calretikulin, einem kalziumbindenden Chaperon, in der Progression des Nierenzellkarzinoms

# INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

# Jakob Neville Eckrich

aus

Frankfurt am Main

Göttingen 2019

Prof. Dr. med. W. Brück

# Betreuungsausschuss

Betreuer/in	Prof. Dr. rer. nat. H. Dihazi
Ko-Betreuer/in:	

# Prüfungskommission

Referent/in	Prof. Dr. rer. nat. H. Dihazi
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. med. G. G. Wulf
Drittreferent/in:	Prof. Dr. hum. biol. M. Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 24.02.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die Rolle von Calretikulin, einem kalziumbindenden Chaperon, in der Progression des Nierenzellkarzinoms" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Köln, den	
	(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

Abl	bbildungsverzeichnis	IV
Tal	abellenverzeichnis	V
Abl	bkürzungsverzeichnis	VI
1	Einleitung	1
1.1	1 Das Nierenzellkarzinom im Überblick	1
1.2	2 Chemotherapie des Nierenzellkarzinoms	2
1.3	3 Cisplatin: Wirkung und Resistenzmechanismen	
1.4	4 Stress im endoplasmatischen Retikulum und der UPR-Signalweg	
1.5	5 Calretikulin: Ein Protein mit multiplen intra- und extrazellulären	Funktionen 6
1.5	CALP and soine Bolle bei peoplestischen Extraplungen	7
1.0	7 Example and Zielectrone	
1./	/ Fragestellung und Zielsetzung	
2	Material & Methoden	9
2.1	1 Material	9
	2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Antikörper und Nukleinsäuren	9
	2.1.2 Verbrauchs- und Reinigungsmaterialien	
	2.1.3 Geräte	14
	2.1.4 Wissenschaftliche Software	
	2.1.5 Biologische Materialien	
2.2	2 Methoden	17
	2.2.1 Zellkultur	
	2.2.2 Trypsinisieren der Zellen	
	2.2.3 Behandlung der Zellen mit Cisplatin	
	2.2.4 Behandlung der Zellen mit Tunicamycin (TM)	
	2.2.5 Ernten der Zellen bzw. Gewinn des Gesamtzelllysats	
	2.2.6 Proteinbestimmung der Proben	
2.3	3 Western-Blot-Analyse	19
	2.3.1 Präparation der Proben	19
	2.3.2 Anfertigung der Minigele	
	2.3.3 SDS-PAGE	
	2.3.4 Tankblotting und Blocken der Membran	21
	2.3.5 Färbung der Membran mit Ponceau S	21
	2.3.6 Inkubation mit dem Primärantikörper	
	2.3.7 Inkubation mit dem Sekundärantikörper	
	2.3.8 Auswertung der Western Blots	23
2.4	4 Immunfluoreszenzfärbung	23
2.5	5 Transfektionen	24
	2.5.1 Transfektion mit Small Interfering Ribonucleic Acid (siRNA)	24

6	Anhang	63
5	Zusammenfassung	61
4.9	Fazit und Ausblick: Die Rolle von Calretikulin in der Chemoresistenz des Nierenzellkarzinoms	59
4.8	Einfluss von CALR auf die Apoptoserate von RCCs unter der Therapie mit Cisplatin	57
4.7	Einfluss von CALR auf die Proliferationsrate von Zellen unter Cisplatin-Therapie	56
4.6	Fazit: ER-Stress in RCCs bei der Therapie mit Cisplatin	55
	4.5.5 Reaktion von RCC-Zellen auf die Therapie mit Tunicamycin (TM)	55
	4.5.4 CALR	54
	4.5.3 ATF6A	<i>53</i> 54
	4.5.1 GRP78 und GRP94	52
4.5	Regulierung von ER-Stressproteinen unter Cisplatin-Therapie	52
4.4	Lokalisation von CALR in RCC-Zelllinien	52
4.3	Behandlung der Zellen mit Cisplatin	51
	4.2.2 Proliferation und Apoptose zum Nachweis des Einflusses von CALR auf die Therapie mit Cisplatin	51
	4.2.1 Regulierung von ER-Stressproteinen und Beteiligung der Chaperon-Funktion von CALR an der Chemoresistenz von RCC-Zelllinien	50
4.2	Methodendiskussion	49
<b>4</b> 4 1	Chemoresistenz des Nierenzellkarzinoms	<b> 49</b> ⊿0
<u>э</u> .э	Dislansion	+/ / በ
30	Cisplatin-Behandlung.	43 47
3.8	Einfluss der CALR-Expressionsregulierung auf die Apoptoserate in RCC-Zellen unter	
3.7	Proliferation von RCC-Zellen mit hochregulierten ER-Stressproteinen	43
3.6	Einfluss der CALR-Expressionsregulierung auf die Proliferation von RCC-Zellen unter Cisplatin-Behandlung	38
3.5	Veränderung der Expression von CALR in RCC-Zellen	37
3.4	Regulierung von ER-Stressproteinen in RCC-Zellen unter Behandlung mit Tunicamycin (TM)	37
3.3	Einfluss der Behandlung mit Cisplatin auf die Regulierung von ER-Stressproteinen in RCC-Zelllinien	30
3.2	Lokalisation von CALR in RCC-Zelllinien unter Cisplatin-Behandlung	28
3.1	Einfluss der Cisplatin-Behandlung auf das Überleben von RCC-Zelllinien	27
3	Ergebnisse	27
2.7	Annexin-V-FITC-Assay/Durchflusszytometrie	26
2.6	Zell-Viabilitäts-Assay/MTT-Test	25
	2.5.2 Transfektion mit Plasmid	25

7	Literaturverzeichnis	67
	6.1.2 Proliferationsassays mit Tunicamycin (TM)	66
	6.1.1 Western-Blot-Analysen mit Tunicamycin (TM)	
6.1	Abbildungen	63

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Eine graphische Darstellung der Strukturformel von Cisplatin	3
Abbildung 2: Der unfolded-protein-response(UPR)-Signalweg in eukaryotischen Zellen	5
Abbildung 3: Blotting-Packschema	21
Abbildung 4: Lichtmikroskopische Analyse von A498-Zellen unter Cisplatin-Behandlung	27
Abbildung 5: Lichtmikroskopische Analyse von Caki-2-Zellen unter Cisplatin-Behandlung	28
Abbildung 6: Immunfluoreszenzfärbung von CALR in A498-Zellen unter Cisplatin- Behandlung	29
Abbildung 7: Immunfluoreszenzfärbung von CALR in Caki-2-Zellen unter Cisplatin- Behandlung	30
Abbildung 8: Western-Blot-Analyse und Quantifizierung der CALR-Expressionslevel in A498- und Caki-2-Zelllinien unter Cisplatin-Behandlung	31
Abbildung 9: Western-Blot-Analyse und Quantifizierung der Expressionslevel von GRP78 in A498- und Caki-2-Zelllinien unter Cisplatin-Behandlung	32
Abbildung 10: Western-Blot-Analyse und Quantifizierung der Expressionslevel von GRP94 in A498- und Caki-2-Zelllinien unter Cisplatin-Behandlung	33
Abbildung 11: Western-Blot-Analyse und Quantifizierung der Expressionslevel von ERP57 in A498- und Caki-2-Zelllinien unter Cisplatin-Behandlung	34
Abbildung 12: Western-Blot-Analyse und Quantifizierung der Expressionslevel der ATF6A- p90-Einheit in A498- und Caki-2-Zelllinien unter Cisplatin-Behandlung	35
Abbildung 13: Western-Blot-Analyse und Quantifizierung der Expressionslevel der ATF6A- p50-Untereinheit in A498- und Caki-2-Zelllinien unter Cisplatin-Behandlung	36
Abbildung 14: Western-Blot-Analyse zur Erfolgskontrolle der Transfektionen	38
Abbildung 15: Einfluss von CALR-Herunterregulierung auf die Proliferation von RCC-Zellen unter Cisplatin-Behandlung	40
Abbildung 16: Einfluss der CALR-Hochregulierung auf die Proliferation von RCC-Zellen unter Cisplatin-Behandlung	42
Abbildung 17: Einfluss der CALR-Herunterregulierung (KD) auf die Apoptoserate von RCC- Zellen unter Cisplatin-Behandlung	45
Abbildung 18: Apoptoserate von Caki-2-Zellen mit hochreguliertem CALR unter Cisplatin- Behandlung	46
Abbildung 19: Zusammenfassende Darstellung der Regulierung von ER-Stressproteinen unter Cisplatin-Behandlung	47
Abbildungen im Anhang	

Abbildung Anhang 1: Western-Blot-Analysen von A498 und Caki-2 mit CALR und anderen	
ER-Stressproteinen unter TM-Behandlung	65
Abbildung Anhang 2: Proliferation von RCC-Zelllinien mit veränderter Regulierung von ER-	
Stressproteinen gegen Kontrolle unter Cisplatin-Behandlung	66

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien mit Angabe des Herstellers	9
Tabelle 2: Enzyme und Proteine mit Angabe des Herstellers	11
Tabelle 3: Antikörper und Antiseren mit Angabe des Herstellers	11
Tabelle 4: Nukleinsäuren mit Angabe des Herstellers	12
Tabelle 5: Verbrauchs- und Reinigungsmaterialen mit Angabe des Herstellers	12
Tabelle 6: Geräte mit Angabe von Modell und Hersteller	14
Tabelle 7: Verwendete Software mit Angabe der Verwendungsart und des Herstellers	15
Tabelle 8: Pipettierschema zur Erstellung der Bradford-Eichkurve	19
Tabelle 9: Pipettierschema zur Erstellung der Gele für die SDS-PAGE	20
Tabelle 10: Verdünnung des Primärantikörpers	22
Tabelle 11: Zusammenfassung von Proliferations- und Apoptoserate von RCC-Zelllinien unter Cisplatin-Behandlung	48

# Abkürzungsverzeichnis

ABB	Annexin-Bindepuffer, annexin-binding buffer
ACTB	ß-Aktin, actin beta
ATCC	american type culture collection
ATF6A	activating transcription factor 6 alpha
CALR	Calretikulin
$CO_2$	Kohlenstoffdioxid
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DAPI	Diamidinophenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure, deoxyribonucleic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERP57	endoplasmic reticulum resident protein 57
FCS	fetales Kälberserum, fetal calf serum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Formazan	Dimethylthiazoldiphenylformazan
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
GRP78	78 kDa glucose-regulated protein
GRP94	94 kDa glucose-regulated protein
HCl	Salzsäure
IRE 1	inositol-requiring enzyme 1
ICD	immunologischer Zelltod, immunogenic cell death
mRCC	metastasiertes Nierenzellkarzinom, metastatic renal cell carcinoma
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure, messenger ribonucleic acid
МТТ	Dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate-buffered saline
PERK	protein kinase R(PKR)-like endoplasmic reticulum kinase
PI	Propidiumiodid
RCC	Nierenzellkarzinom, renal cell carcinoma
RKI	Robert Koch-Institut
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
siRNA	small interfering ribonucleic acid
ZfKD	Zentrum für Krebsregisterdaten

# 1 Einleitung

# 1.1 Das Nierenzellkarzinom im Überblick

Nierenzellkarzinome (RCCs, *renal cell carcinoma*), auch als Hypernephrome oder Gravitz-Tumore bezeichnet, machen etwa 90 % der bösartigen Erkrankungen der Niere aus. Sie sind eine histologisch heterogene Gruppe, wobei das klarzellige Nierenzellkarzinom mit 75 % den häufigsten Subtyp darstellt (Herold 2017, S. 651). Nach Daten des Robert Koch-Instituts aus dem Jahr 2012 belegt das RCC mit 3,8 % der Neuerkrankungen bei Männern und 2,4 % bei Frauen Platz sechs bzw. Platz zehn aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland (RKI und GEKID 2015). Weltweit betrug die Zahl der Neuerkrankungen im Jahr 2012 338.000 Fälle und machte damit 2,4 % aller malignen neoplastischen Neuerkrankungen aus (Ferlay et al. 2015). Die Mortalität des RCC hat in den letzten Jahren weltweit deutlich zugenommen von 54.000 Todesfällen im Jahr 1985 auf 102.000 Todesfälle im Jahr 2001 und 144.000 im Jahr 2012 (Mickisch et al. 2001a; Ferlay et al. 2015) . Die Inzidenz von Tumoren der Niere in Deutschland ist in den letzten 15 Jahren kontinuierlich von 12.416 Fällen im Jahr 1997 auf 15.402 Fällen im Jahr 2012 gestiegen (ZfKD 2017).

Das Nierenzellkarzinom zeigt meist keine Frühsymptome. Hämaturie, Flankenschmerzen und das Gefühl einer abdominellen Raumforderung als klassische Trias treten in weniger als 10 % der Fälle und meist in späteren Stadien der Erkrankung auf (Sachdeva et al. 2017). Dies hat zur Folge, dass das RCC in einem Viertel der Fälle erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird und in 16 % der Fälle zum Zeitpunkt der Diagnose bereits metastasiert hat (RKI und GEKID 2015; Siegel et al. 2016). Während das RCC in frühen Erkrankungsstadien gut therapierbar ist - die Fünfjahresüberlebensrate für lokalisierte Stadien liegt durchschnittlich bei 93 % - wird die Prognose in fortgeschrittenen Stadien hingegen deutlich schlechter. Metastasierte Tumoren weisen aktuell eine Fünfjahresüberlebensrate von 12 % auf (American Cancer Society 2017). Therapeutisch kommen in frühen Stadien vor allem operative Verfahren zum Einsatz (Butler et al. 1995; van Poppel et al. 2007). In fortgeschrittenen Stadien wird zunächst in vielen Fällen eine zytoreduktive Nephrektomie durchgeführt (Flanigan et al. 2004; Mickisch et al. 2001b), dann kommen immuntherapeutische und targetgerichtete Therapieverfahren mit Einsatz von Zytokinen, Angiogenesehemmern, Immuncheckpoint-Inhibitoren und Mammalian-Target-of-Rapamycin(mTOR)-Inhibitoren zur Anwendung (Escudier et al. 2007; Hudes et al. 2007; Motzer et al. 2008 und 2015). Trotz erheblicher Fortschritte in der Therapie metastasierter Nierenzellkarzinome (mRCC, metastatic renal *cell carcinoma*) zeigen die meisten Patienten unter Behandlung eine Progression der Erkrankung und versterben schließlich daran (Jonasch et al. 2014; Rodriguez-Vida et al. 2017).

### 1.2 Chemotherapie des Nierenzellkarzinoms

Beim metastatischen Nierenzellkarzinom (mRCC) kommt keine klassische antineoplastische Behandlung – einschließlich Chemotherapie in neoadjuvanten, adjuvanten und palliativen Regimen – zum Einsatz, weil von einer Strahlen- sowie Chemoresistenz ausgegangen wird (Motzer et al. 1996; Lilleby und Fosså 2005). Aktuelle Studien konnten zeigen, dass die Ansprechraten von mRCCs auf eine Polychemotherapie mit neueren Substanzen etwa 8-23 % betragen. Der Einsatz bleibt dabei einzelnen Fällen und wenigen Subtypen vorbehalten (Buti et al. 2013). In den deutschen Leitlinien wird hingegen sogar explizit von einer chemotherapeutischen Behandlung von mRCCs abgeraten (Leitlinienprogramm Onkologie 2017). Beteiligt an Mechanismen der Resistenzentwicklung des RCC sind u. a. das *multidrug-resistance 1 protein*, Glutathiontransferasen und das *b-cell lymphoma 2 protein* (Bcl-2) (Mickisch et al. 1990 und 1994; Kausch et al. 2005). Die Mechanismen der Beteiligung dieser Moleküle sind aber bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht ausreichend verstanden (Zhang et al. 2016).

Neuere targetgerichtete Therapien wirken zwar im metastasierten Stadium der Erkrankung lebensverlängernd, führen aber bis auf wenige Einzelfälle nicht zur Remission (siehe Kapitel 1.1). Dabei wird beispielsweise eine mediane Überlebensrate von 22 Monaten von Heng et al. (2009) unter Therapie mit Angiogeneseinhibitoren angegeben. Allerdings spricht ein Teil der Patienten mit einem mRCC schon initial nicht auf die targetgerichtete Therapie an und in den übrigen Fällen entwickelt sich im Verlauf eine Resistenz auf die verwendeten Therapeutika (Bergers und Hanahan 2008). Die Entwicklung wirksamerer systemischer Therapien ist daher für die Verbesserung der Überlebensrate von mRCC-Patienten erforderlich. Eine Umgehung der Chemoresistenz könnte dabei eine entscheidende Rolle spielen.

#### 1.3 Cisplatin: Wirkung und Resistenzmechanismen



Abbildung 1: Eine graphische Darstellung der Strukturformel von Cisplatin

Cisplatin (oder cis-Diammindichloroplatin, Abbildung 1) ist ein häufig eingesetztes Chemotherapeutikum. Seine antiproliferative Wirkung wurde erstmals von Rosenberg et al. (1965) beschrieben. Cisplatin findet bei einer großen Anzahl solider Tumoren Anwendung: Kleinzellige Bronchial- und Ovarialkarzinome (Go und Adjei 1999), Hodenkarzinome (Wit et al. 1998), Harnblasenkarzinome (Maase et al. 2000) und Karzinome des Kopf-Halsbereiches (Blanchard et al. 2013) werden mit Cisplatin meist in Kombination mit anderen Chemotherapeutika behandelt. Cisplatin gehört zur Gruppe der Alkylanzien, d. h., es wirkt hauptsächlich über die Bindung an Desoxyribonukleinsäure (DNA, deoxyribonucleic acid) (Akaboshi et al. 1992) und deren Quervernetzung (Sherman et al. 1985; Eastman 1987; Jamieson und Lippard 1999). Dies führt zu einer Schädigung der DNA, Störung der Replikation sowie zum Zellzyklusarrest und nach Überschreiten einer gewissen Schwelle zur Apoptose der Zelle (Basu und Krishnamurthy 2010). Cisplatin ist in seiner Wirkung sehr potent, seine Einsatzmöglichkeiten werden jedoch durch mehrere Faktoren eingeschränkt: Zunächst gibt es eine Reihe teils schwerer Nebenwirkungen, dabei ist vor allem die Nephrotoxizität dosislimitierend (Gonzalez-Vitale et al. 1977; Dentino et al. 1978; Goldstein und Mayor 1983). Weiterhin stellt die Entwicklung von Resistenzen eines der Hauptprobleme in der Behandlung dar. Diese wurde bereits ausführlich untersucht und es sind bis zum aktuellen Zeitpunkt mehrere Mechanismen von Perez (1998), Kartalou und Essigmann (2001) sowie Galluzzi et al. (2012) beschrieben: Verminderte Aufnahme von Cisplatin in die Zelle oder erhöhter Efflux aus der Zelle, Detoxifikation in der Zelle, meist durch Glutathion- oder Metallothionein vermittelt, Veränderung von (meist apoptosevermittelnden) Signalkaskaden in der Zelle, Steigerung der DNA-Reparatur und vermehrte Toleranz von DNA-Addukten. Neben der nukleusabhängigen Wirkung von Cisplatin über die Quervernetzung von DNA ist aber auch ein vom Nukleus unabhängiger Wirkungsmechanismus bekannt.

Mandic et al. (2003) wiesen in zytoplastischen, d. h. enukleierten Melanom- und Kolonkarzinomzellen dennoch die Aktivierung von zu Apoptose führenden Signalwegen bei Behandlung mit Cisplatin nach. Beteiligt sind dort vor allem auch solche Signalwege, die über die Induktion von Stress im endoplasmatischen Retikulum (ER-Stress, genauere Erläuterung siehe Kapitel 1.4) ablaufen: Eine erhöhte Expression des *78 kDa glucose-regulated protein* (GRP78) und eine Aktivierung ER-spezifischer Apoptose-Signale wiesen auf einen ER-vermittelten Apoptose-Signalweg hin. ER-vermittelte Apoptose als Wirkung von Cisplatin konnte von Liu und Baliga (2005) *in vitro* an Nierentubuluszellen und von Peyrou et al. (2007) *in vitro* an Nierengewebe von Ratten bestätigt werden.

Die letztgenannten Autoren untersuchten die Rolle von nukleusunabhängiger Apoptose in Bezug auf nephrotoxische Wirkungen von Cisplatin. Mandic et al. (2003) zeigten eine Aktivierung des Apoptose-Signalweges in Melanom- und Kolonkarzinom-Zellen. In zwei weiteren Publikationen (Yu et al. 2011; Xu et al. 2012) konnte eine Beteiligung von ER-Stress an cisplatinvermittelter Apoptose in Zervix- und Ovarialkarzinomzellen nachgewiesen werden. Die Rolle von nukleusunabhängiger Apoptose in der chemotherapeutischen Behandlung und Resistenzentwicklung von Nierenzellkarzinomen ist jedoch noch nicht erforscht.

#### 1.4 Stress im endoplasmatischen Retikulum und der UPR-Signalweg

Verschiedene pathologische Zustände können ER-Stress in Zellen auslösen: Kalziumdepletion des ER (Li et al. 1993), Glukosemangel (Subjeck und Shyy 1986), chronischer Alkoholkonsum (Hsieh et al. 1996), virale Infektionen und viele weitere Stressfaktoren der Zelle haben einen Einfluss auf die Funktionalität des ER und führen zur Akkumulation von unoder fehlgefalteten Proteinen (Lee 2001). Auch Tunicamycin (TM) als Inhibitor der N-terminalen Glykosylierung von Proteinen ist ein potenter Auslöser von ER-Stress (Lee 1987; Olden et al. 1979). Dieses vermehrte Anfallen von un- bzw. fehlgefalteten Proteinen ist als Pathomechanismus für die Entstehung von verschiedenen Krankheitsbildern wie beispielsweise neurodegenerativen Erkrankungen oder Diabetes mellitus Typ 2 bekannt (Selkoe 2003; Dobson 2003; Eizirik et al. 2008).



Abbildung 2: Der unfolded-protein-response(UPR)-Signalweg in eukaryotischen Zellen

Nach Biden et al. (2014). GRP78 wird in der Grafik als "*binding-immunoglobulin protein*" (BiP) (ein weitverbreiteter alternativer Name des Proteins) bezeichnet. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags und des Erstautors.

Eine wichtige Rolle bei der Reaktion der Zelle auf ER-Stress nimmt der *unfolded-proteinresponse*(UPR)-Signalweg ein (Abbildung 2, Reprinted from Lipotoxic endoplasmic reticulum stress,  $\beta$  cell failure, and type 2 diabetes mellitus. Trends Endocrinol Metab 25, Biden TJ, Boslem E, Chu KY, Sue N (2014), 389–398, Copyright (2014), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]). Dieser Signalweg wird aktiviert, wenn vermehrt un- oder fehlgefaltete Proteine in der Zelle anfallen (Kaufman 1999), um die Faltung dieser Proteine zu fördern und die Homöostase und Funktionsfähigkeit der Zelle zu erhalten. Gemeinsamer Konsens ist derzeit, dass GRP78, ein wichtiges Chaperon des ER, im Lumen des ER die Faltung von fehlgefalteten Proteinen unterstützt. Dabei dissoziiert es von den membranständigen Proteinen *activating transcription factor 6 alpha* (ATF6A), *inositolrequiring enzyme 1* (IRE 1) und *protein kinase* R (PKR)-*like endoplasmic reticulum kinase* (PERK), was diese wiederum aktiviert (Shen et al. 2002; Liu et al. 2000 und 2003; Bertolotti et al. 2000). ATF6A, IRE 1 und PERK stoppen den Zellzyklus (Brewer und Diehl 2000) und dabei insbesondere die Translation von weiteren Proteinen (Harding et al. 2000). Zudem aktivieren sie über verschiedene Signalwege Transkriptionsfaktoren, die zur vermehrten Expression von Chaperonen des ER, vornehmlich GRP78 und des *94 kDa glucose-regulated protein* (GRP94) aber auch Calretikulin (CALR) führen (Kozutsumi et al. 1988; Waser et al. 1997; Yoshida et al. 1998). ATF6A als Protein, welches in dieser Arbeit noch genauer untersucht wird, wird am Golgi-Apparat von seiner inaktiven p90-Einheit in seine aktive p50-Untereinheit gespalten (Haze et al. 1999). Letztere führt als Transkriptionsfaktor zur vermehrten Expression der bereits genannten ER-Chaperone CALR, GRP78 und GRP94. Die Zunahme der Expression dieser Chaperone führt zur verstärkten Faltung der bislang ungefalteten Proteine, wodurch die Homöostase der Zelle wiederhergestellt wird. Hält der Stresszustand des ER über einen verlängerten Zeitraum an oder sind die Faltungskapazitäten des ER überlastet, wird die Apoptose der Zelle eingeleitet (Rutkowski und Kaufman 2004; Rao und Bredesen 2004).

# 1.5 Calretikulin: Ein Protein mit multiplen intra- und extrazellulären Funktionen

Calretikulin (CALR) ist ein 46 kDa großes Protein, das erstmals von Ostwald und MacLennan (1974) als kalziumbindendes Protein des sarkoplasmatischen Retikulums beschrieben wurde. Es ist in verschiedenen Spezies hoch konserviert und, mit Ausnahme von Erythrozyten, in allen Zellen höher entwickelter Organismen zu finden (Krause und Michalak 1997). CALR besteht aus drei strukturell unterschiedlichen Domänen (Fliegel et al. 1989; Smith und Koch 1989) und übt eine Reihe verschiedener Funktionen innerhalb und außerhalb der Zelle aus.

CALR ist eines der wesentlichen kalziumbindenden Proteine des ER. Es bindet Kalzium mit hoher Kapazität (Baksh und Michalak 1991) und beeinflusst so die Kalziumhomöostase sowie verschiedene kalziumabhängige Signalwege in der Zelle (Corbett und Michalak 2000). CALR fungiert im ER zudem als ein essenzielles lektinähnliches Chaperon (Spiro et al. 1996). In einem gemeinsamen Zyklus mit Calnexin und dem endoplasmic reticulum resident protein 57 (ERP57) unterstützt es die Faltung von Glykoproteinen der Zelle. Letztere sind u. a. integrale Membranproteine oder werden als Proteine sezerniert. Somit beeinflusst CALR nicht nur die Integrität der Zelle selbst, sondern auch deren Umgebung und Kommunikation mit anderen Zellen (Michalak et al. 2002). Auch über die zytosolische Bindung an Integrine ist CALR an der Zelladhäsion und -mobilität beteiligt (Rojiani et al. 1991). So ist die Fähigkeit zur integrinvermittelten Adhäsion in CALR-defizienten Stammzellen schwer gestört (Coppolino et al. 1997).

#### 1.6 CALR und seine Rolle bei neoplastischen Erkrankungen

In aktuelleren Studien geraten vermehrt immunologische Funktionen von CALR in den Fokus. So ist es an der korrekten Faltung und Zusammensetzung von MHC-l-Molekülen beteiligt, die unabdingbar für deren Erkennung durch zytotoxische T-Zellen ist (Gao et al. 2002). Zudem spielt CALR eine wichtige Rolle, wenn es an die Zelloberfläche verlagert wird. Dort ist es involviert in die Phagozytose gestresster, apoptotischer und neoplastischer Zellen (Gardai et al. 2005). Weiterhin identifizierten Obeid et al. (2007) durch *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen die Membranexposition von CALR als das zentrale Signal einer durch Chemotherapie getriggerten Immunantwort auf Tumoren, die zum sogenannten immunologischen Zelltod (ICD, *immunogenic cell death*) führt. Es wurde gezeigt, dass durch eine Vorbehandlung von Mäusen mit Injektion von mit Chemotherapie vorbehandelten Tumorzellen bei anschließender Injektion von nicht-vorbehandelten Tumorzellen im Gegensatz zu Kontrollzellen eine Ausbreitung des Tumors verhindert wurde. Somit wurde mittels CALR -Exposition nach dem Prinzip einer Impfung eine tumorspezifische Immunabwehr aufgebaut.

Neben seiner Funktion an der Zelloberfläche ist CALR aber auch an der Progression vieler Tumoren beteiligt. Es wird als möglicher Tumormarker für Harnblasenkarzinome und Karzinome des oberen Urogenitaltrakts beschrieben (Lu et al. 2014; Kageyama et al. 2004). Ebenso kommt es als diagnostischer Marker bei Janus-Kinase-2-negativen myeloproliferativen Erkrankungen in Betracht (Nangalia et al. 2013; Klampfl et al. 2013). Außerdem ist es an der Progression und Invasivität von Ösophaguskarzinomen beteiligt (Shi et al. 2014). Bei einer großen Anzahl an weiteren Tumoren ist CALR in der Zelle hochreguliert und hohe CALR-Konzentrationen sind teilweise mit deren vermehrter Invasivität, erhöhter Metastasierungsrate und schlechterer Prognose assoziiert (Chen et al. 2009; Bini et al. 1997; Lwin et al. 2010; Yoon et al. 2000; Du et al. 2007).

Arbeiten der Arbeitsgruppe um Dihazi et al. (2013) zeigten einen Zusammenhang von CALR mit Nierenfibrose und chronischer Niereninsuffizienz. Die Rolle von Calretikulin in Bezug auf Entwicklung, Metastasierung und Resistenzentwicklung von Nierenzellkarzinomen ist jedoch noch nicht untersucht.

### 1.7 Fragestellung und Zielsetzung

Metastasierte Nierenzellkarzinome bleiben trotz verbesserter Therapiemöglichkeiten eine Erkrankung mit meist infauster Prognose. Chemotherapie findet wegen intrinsischer Resistenz bei mRCCs keine standardmäßige Anwendung. Aktuelle Studien diskutieren jedoch eine mögliche Wirksamkeit von Polychemotherapie oder Kombinationen von Immuntherapeutika und Chemotherapie (Buti et al. 2013). Cisplatin als viel verwendetes Chemotherapeutikum löst in einem nukleusunabhängigen Signalweg über vermehrten ER-Stress Apoptose aus (Mandic et al. 2003). CALR ist ein Protein mit multiplen zellulären Funktionen u. a. als essenzielles Chaperon des ER. Gleichzeitig ist es über weitere Funktionen an der Progression vieler Tumoren beteiligt (siehe Kapitel 1.6) und vermittelt über seine Lokalisation an der Zelloberfläche ICD, einen Signalweg, über den eine wiederhergestellte Wirksamkeit von Cisplatin belegt wurde (Martins et al. 2011).

Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Beteiligung von CALR an der Progression und Chemoresistenz des Nierenzellkarzinoms zu überprüfen. Um diese Frage zu erörtern, wurden zwei RCC-Zelllinien mit hoch- und herunterreguliertem CALR etabliert und auf ihre Proliferations- und Apoptoserate während der Therapie mit Cisplatin untersucht. In diesem Zusammenhang sollte weiterhin spezifiziert werden, ob CALR als wichtiges ER-Chaperon die Chemoresistenz von RCC-Zelllinien über die Reduktion von ER-Stress beeinflusst. Dafür wurde unter Therapie mit Cisplatin zum einen die Regulierung von CALR und anderen ER-Stressproteinen des UPR-Signalweges bestimmt und zum anderen wurden Immunfluoreszenz-Färbungen von CALR angefertigt, um dessen Lokalisation in der Zelle zu untersuchen. Weiterhin wurde TM zur Hochregulierung von ER-Stressproteinen in RCC-Zelllinien genutzt und diese anschließend auf ihre Proliferationsrate unter Cisplatin-Therapie untersucht. Sollte CALR an der Chemoresistenz von Nierenzellkarzinomen beteiligt sein, könnten sich weitere Arbeiten anschließen, um den Mechanismus der Resistenz genauer zu charakterisieren und Möglichkeiten der Umgehung zu erforschen.

Eine Beeinflussung der Chemoresistenz könnte die Therapie von mRCCs deutlich verbessern. Nicht nur könnte Patienten, die initial nicht auf neuere Therapeutika (siehe Kapitel 1.1) ansprechen oder bei denen eine Resistenz gegen diese entstanden ist, eine Alternativtherapie zur Verfügung stehen, sondern Chemotherapie auch Teil der Erstlinientherapie werden und das Überleben der Patienten verbessern.

# 2 Material & Mehoden

# 2.1 Material

# 2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Antikörper und Nukleinsäuren

2.1.1.1 Chemikalien

# Tabelle 1: Verwendete Chemikalien mit Angabe des Herstellers

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid, Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe
Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aka Solv (Aqua Care Solution)	Akaria-Chemie, Mannheim
Bradford-Reagenzien	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Butanol	Merck, Darmstadt
Cell Proliferation Kit	Roche, Mannheim
Cholamidopropyldimethylammonio-pro- pansulfonat	Merck, Darmstadt
Cisplatin	EMD Millipore Corp., Billerica, MA, USA
Diamidinophenylindol	Boehringer, Mannheim
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Eindeckmedium (Immu Mount)	Shandon, Pittsburgh, PA, USA
Eukitt	Kindler, Freiburg

Essigsäure (5 %)	Roth, Karlsruhe
fetales Kälberserum	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure (Hepes) Puffer (1M)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Hygromycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lipofectamin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
MEM-Non-Essential Amino-Acids (100x)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Mercaptoethanol (98 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol (99 %)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	Merck, Darmstadt
OPTI-MEM-Medium	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Fluka, Seelze
phosphate-buffered saline (PBS)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Ponceau S (0,2 %)	Serva, Heidelberg
Roswell Park Memorial Institute (RPMI)- Medium	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Roti-Blue	Roth, Karlsruhe
Precision Plus Protein Standards (Western- Blot-Marker)	Bio-Rad, München
Polysorbat 20	Roth, Karlsruhe

Salzsäure rauchend 37 %	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Streptomycin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trisaminomethan-Puffer	Roth, Karlsruhe
Triton X 100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tunicamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Harnstoff (Urea)	Sigma-Aldrich, Steinheim

# 2.1.1.2 Enzyme und Proteine

# Tabelle 2: Enzyme und Proteine mit Angabe des Herstellers

Enzyme	Hersteller
Bovines Serumalbumin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

# 2.1.1.3 Antikörper und Antiseren

# Tabelle 3: Antikörper und Antiseren mit Angabe des Herstellers

Antikörper	Hersteller
Anti-ATF6A (Maus)	Acris Antibodies Gmbh, Herford
Anti-ß-Actin (Maus)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-CALR (Ziege)	Abcam, Hamburg
Anti-CALR (Kaninchen)	Cell signaling, Danvers, MA, USA
Anti-ERP57 (Maus)	Enzo, Farmingdale, NY, USA
Anti-GRP78 (Kaninchen)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-GRP94 (Kaninchen)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Alexa Fluor 488 Ziege Anti-Kaninchen	Invitrogen, Eugene, OR, USA

Alexa Fluor 555 Ziege Anti-Kaninchen	Life technologies, Eugene, OR, USA
Alexa Fluor 647 Esel Anti-Ziege	Life technologies, Eugene, OR, USA
Alexa Fluor 647 Ziege Anti-Maus	Life technologies, Eugene, OR, USA
Alexa Fluor 647 Ziege Anti-Kaninchen	Life technologies, Eugene, OR, USA
Ziegenserum	Sigma-Aldrich, Steinheim

#### 2.1.1.4 Nukleinsäuren

#### Tabelle 4: Nukleinsäuren mit Angabe des Herstellers

Nukleinsäure	Hersteller
NSC (Non-specific-siRNA) 47 % GC	Eurofins Genomics, Ebersberg
Plasmid DNA CALR	Eurofins Genomics, Ebersberg
siRNA CALR 437	Eurofins Genomics, Ebersberg
siRNA CALR 1190	Eurofins Genomics, Ebersberg

# 2.1.2 Verbrauchs- und Reinigungsmaterialien

#### Tabelle 5: Verbrauchs- und Reinigungsmaterialen mit Angabe des Herstellers

Material	Hersteller
6-Well-Multiwell-Platten	Falcon, Corning, NY, USA
8-Kammer-Objektträger	Nunc, Rochester, NY, USA
96-Well-Platten	Falcon, Corning, NY, USA
Abwiegeschalen	Haushaltswaren
Alkohol 99 %	Chemsolute, Geyer Gmbh, Renningen
Alufolie	Haushaltswaren
Barrycidal 30	Interchem, Zürich, Schweiz
Deckgläser 20x26mm	Thermo Scientific, Braunschweig
Einmalskalpell	Feather, Köln
Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht

Eisbad	Neolab, Heidelberg	
Filterpapier	Bio-Rad, München	
Gelfärbeschalen	Roth, Karlsruhe	
Glasplatten	Bio-Rad, München	
Glasflaschen 100, 500, 1000, 2000ml	Schott Duran, Elmsford, NY, USA	
Handschuhe Gentle Skin Sensitive	Meditrade, Kettering, UK	
Handschuhe Nitril Next Gen	Meditrade, Kettering, UK	
Labortücher Papier	Kimberley Clark, Reigate, UK	
Labortücher Stoff	Kimberley Clark, Reigate, UK	
Meliseptol 1000ml	Braun, Melsungen	
Nitrocellulose-Blotmembran	GE Healthcare, Amersham, UK	
Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Poly- merase Chain Reaction)-Röhrchen 0,2ml	Biozym, Wien, Österreich	
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim	
Petrischalen 100 x 15mm	Falcon, Corning NY, USA	
Pinzetten	Haushaltswaren	
Pipettenspitzen 10, 100, 1000µl	Eppendorf, Hamburg	
Pipettenspitze für Multipipette 500µl, 2,5ml	nl Eppendorf, Hamburg	
Runde Polystyrene Röhrchen 5ml	Falcon, Corning NY, USA	
Reaktionsgefäße 500, 1000, 2000µl	Eppendorf, Hamburg	
Reaktionsröhrchen 15, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht	
Rührspatel	Sarstedt, Nümbrecht	
Serologische Pipette 5,10ml	Sarstedt, Nümbrecht	
Serologische Pipette 20ml	Greiner bio-one, Kremsmünster, Öster- reich	
TC Flasche 75, 175ml (Zellkulturflasche)	Sarstedt, Nümbrecht	
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht	

# 2.1.3 Geräte

Tabelle 6: Geräte mit Angabe von Mod	dell und Hersteller
--------------------------------------	---------------------

<u>Gerät</u>	Modell	<u>Hersteller</u>
Abzug Zellkultur	BSB4A	Gelaire, Sydney, Australia
Absaugpumpe	095 AN. 18	Schütt, Göttingen
CO2-Inkubator	Napco 5400	Thermo Scientific, Braun- schweig
Elektrophorese-Gerät	PS 3002	Life technologies, Carlsbad, CA, USA
Elektrophorese-Gerät	2301 Macro Drive	LKB, Bromma, Schweden
Elektrophorese-Behälter	Mini-Protean 3 Cell	Bio-Rad, München
ELISA-Reader	iMark microplate reader	Bio-Rad, München
Durchflusszytometer	FACS Canto ll	BD Biosciences, Franklin Lakes, NY, USA
Grammwaage	Universal	Sartorius, Göttingen
Hirschmann-Pipette	Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Kocher	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Kühlschrank	GlassLine	Liebherr, Bulle
Kühlschrank	Premium	Liebherr, Bulle
Kühlschrank	Premium Nofrost	Liebherr, Bulle
Kühlschrank	MDF-U5312	Sanyo, Moriguchi, Japan
Kühlschrank	MDF-U536	Sanyo, Moriguchi, Japan
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop/Laser	IX-71	Olympus, Hiroyuki Sasa, Japan
Mikroskop	Axiovert 200	Zeiss, Oberkochen
Milligrammwaage	1773	Sartorius, Göttingen

Oberflächen-	IKA	Janke & Kunkel Gmbh, Stau-
heizplatte/Schüttler		fen
Ofen	Combimag Reo	Heraeus, Hanau
pH-Meter	PB-11	Sartorius, Göttingen
Photometer	Lambda 25	Perkin Elmer, Waltham, MA,
		USA
Pipette 1000, 100, 10µl	Reference	Eppendorf
Laserscanner	FLA 5100	Fujifilm, Shigetaka Komori, Ja-
		pan
Schüttelofen	400	Robbins Scientific, Sunnyvale,
		CA, USA
Schüttelofen	Kühner	Braun, Melsungen
Voltmeter	Power Pack 35/75	Phase, West Germany
Vortexer	Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik,
		Burgwedel
0,1mm Zählkammer	Neubauer Improved	Assistent, Sondheim v. d. Rhön
Zentrifuge	3-18K	Sigma, Osterode
Zentrifuge	1-15PK	Sigma, Osterode
Zentrifuge	5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	5424R	Eppendorf, Hamburg

# 2.1.4 Wissenschaftliche Software

# Tabelle 7: Verwendete Software mit Angabe der Verwendungsart und des Herstellers

<u>Programm</u>	Verwendung	<u>Hersteller</u>
Cell-D Version 3.4	Imaging Software für Life Science Technologies	Olympus, Hiroyuki Sasa, Japan

Citavi 5	Literaturverwaltung und - zitation	Microsoft Corp. Redmond, WA, USA
Excel 2010	Tabellenkalkulation	Microsoft Corp. Redmond, WA, USA
BD FACS Diva, Version 6.1.3	Software zur Bedienung des Durchflusszytometers	BD Biosciences, Franklin La- kes, NY, USA
Graph Pad Prism 6	Software zur statistischen Datenanalyse	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
iCys, Version 3.4.12.92	Steuerungssoftware Mikro- skop	Olympus, Hiroyuki Sasa, Japan
Image J Version 1.40g	Bildauswertungssoftware	Wayne Rasband, National In- stitutes of Health, USA
Image Reader FLA 5000 Version 3.0	Fluoreszenzscanner-Soft- ware	Fujifilm, Shigetaka Komori, Ja- pan
Microplate Manager 6	Software zur Bedienung des ELISA-Reader	Bio-Rad, München
PALM@Robo Version 3.2.0.11	Mikroskopsteuerungs- programm	P.A.L.M. Microlaser Technologies Gmbh, Bernried
Word 2016	Textverarbeitung	Microsoft Corp. Redmond, WA, USA

# 2.1.5 Biologische Materialien

In dieser Arbeit wurde zum einen die Zelllinie Caki-2 und zum anderen die Zelllinie A498 des Herstellers ATCC (*american type culture collection*) verwendet. Caki-2-Zellen (ATCC HTB-47, American type culture collection, Manassas, Virginia) sind humane Karzinom-Zellen epithelialen Ursprungs, isoliert aus einem klarzelligen RCC eines 69-jährigen Patienten.

A498-Zellen (ATCC HTB-44, American type culture collection, Manassas, Virginia) sind humane Karzinom-Zellen epithelialen Ursprungs isoliert aus einem metastasierten RCC unbekannten Subtyps einer 52-jährigen Patientin.

Die Zelllinien sind von der Zelldatenbank ATCC kommerziell zu erwerben.

### 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Zellkulturflaschen aus Polystyrol mit 75 cm<sup>2</sup> und bei transfizierten Zellen teilweise 175 cm<sup>2</sup> wurden im Kohlenstoffdioxid(CO<sub>2</sub>)-Inkubator (Napco 5400, Thermo Scientific, Braunschweig) bei 95 % Raumluft und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Nährmedium wurde für Caki-2-Zellen modifiziertes Roswell-Park-Memorial-Institute(RPMI)-Medium [RPMI 300 mosmol/kg, fetales Kälberserum (FCS, *fetal calf serum*) 10 %, L-Glutamin 1 %, Penicillin/Streptomycin 1 %, Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure-Puffer 2,5 %, nicht-essenzielle Aminosäuren (*non-essential amino acids*) 2 %] und für A498 modifiziertes Dulbecco's-Modified-Eagle(DMEM)-Medium (300 mosmol/kg, FCS 10 %, L-Glutamin 1 %, Penicillin/Streptomycin 1 %) verwendet. Zu 75-cm<sup>2</sup>-Flaschen wurden 10 ml Medium, zu 175-cm<sup>2</sup>-Flaschen 22,5 ml Medium gegeben. Die Zellen wurden täglich mikroskopisch kontrolliert und dabei die Anzahl der toten Zellen, die Zelldichte sowie der Zustand der Zellen beurteilt, um Störfaktoren wie z. B. Kontaminationen auszuschließen.

Caki-2-Zellen sind Tumorzellen mit einer sehr hohen Teilungsrate. Deshalb musste diese Zelllinie alle drei bis fünf Tage trypsinisiert werden. A498-Zellen wurden einmal pro Woche trypsinisiert. Allgemein wurden die Zellen bei maximal 90-95 % Bewachsung der Kulturflaschen auf neue Flaschen verteilt. Alle Arbeiten der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

#### 2.2.2 Trypsinisieren der Zellen

Bei Konfluenz oder teilweise auch bei 90-95 % Bewachsung der Flaschen wurden die Zellen ausgedünnt und auf neue Flaschen verteilt. Dafür wurde das Zellmedium durch 5 ml auf Raumtemperatur angewärmte phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, *phosphate-buffered saline*) ersetzt, um die Zellen zu reinigen. Nach erneutem Absaugen wurden der Flasche 1,5 ml Trypsinlösung [Trypsin (25 %) 20 ml, Ethylendiamintetraacetat (EDTA) 0,33 g, mit PBS auf 200 ml aufgefüllt] zugesetzt und diese für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schalen wurden manuell beklopft, um die Zellen vom Untergrund zu lösen. Im Anschluss wurde mit 10 ml Medium abgespült und unter mehrmaligem Resuspendieren in dieses aufgenommen. Je nach erwünschter Zelldichte wurden 1-5 ml der Lösung auf die neuen Zellschalen verteilt.

### 2.2.3 Behandlung der Zellen mit Cisplatin

Cisplatin (EMD Millipore Corp., Billerica, MA USA) wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) zu einer 100 millimolaren Lösung gelöst. Cisplatin wurde in Kulturmedium zu Endkonzentrationen von 20  $\mu$ M, 50  $\mu$ M und 100  $\mu$ M verdünnt. Das Zellkulturmedium mit den entsprechenden Cisplatin-Konzentrationen wurde den Zellen zugegeben und sanft gekippt, um eine optimale Verteilung zu erreichen. Die Zellen wurden für 48 h im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 24 h erfolgten eine lichtmikroskopische Kontrolle und nach Ablauf der Behandlungszeit von 48 h das Ernten der Zellen.

#### 2.2.4 Behandlung der Zellen mit Tunicamycin (TM)

Zur Überexpression von ER-Stressproteinen wurden die Zellen mit TM in den Konzentrationen 1  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M und 5  $\mu$ M behandelt. TM wurde dem jeweiligen Zellmedium in entsprechender Konzentration zugeführt. Um die Auswirkung der Behandlung auf die Zellproliferation zu untersuchen, wurde die Behandlung für 24 h durchgeführt, sonst betrug der Behandlungszeitraum 72 h.

#### 2.2.5 Ernten der Zellen bzw. Gewinn des Gesamtzelllysats

Für die Gewinnung des Zelllysates wurden Zellen mithilfe eines Zellschabers von den Flaschen abgekratzt, in 5 ml PBS resuspendiert und zwei Mal für 5 min mit 1100 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde je nach Zellmenge in 10-200 µl Lysepuffer [Urea, Cholamidopropyldimethylammoniopropansulfonat 2 %, Dithiotreitol, Phenylmethylsulfonylfluorid] aufgenommen und für 30 min unter mehrmaligem Vortexen lysiert. Es wurde anschließend zwei Mal für 30 min mit 14000 rpm bei 4 °C zentrifugiert und jeweils der Überstand der Lösung erhalten. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren.

#### 2.2.6 Proteinbestimmung der Proben

Für die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration einer Probe wurde eine Bradford-Lösung angesetzt [1:5 Bradford-Reagens zu doppelt destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O)]. Für diese Bradford-Lösung wurde eine Eichkurve unter Bezug auf bovines Serumalbumin unter nachfolgendem Schema (Tabelle 8) erstellt.

Die Extinktionswerte der in Tabelle 8 dargestellten Proteinlösungen wurden mittels Photometer (Lambda 25, Perkin Elmer, Waltham, MA USA) bestimmt.

Aus den Extinktionswerten wurde eine Eichkurve mit linearer Gleichung errechnet. Proben wurden soweit verdünnt, dass der Extinktionswert im linearen Bereich der Eichkurve lag und über die Gleichung die Gesamtproteinkonzentration der Probe erhalten.

Bradford-Reagens	Bovines Serumalbumin
1000 µl (Blank)	0 µl
998 µl	2 µl
996 µl	4 µl
994 µl	6 µl
992 μl	8 µl
990 µl	10 µl

Tabelle 8: Pipettierschema zur Erstellung der Bradford-Eichkurve

### 2.3 Western-Blot-Analyse

Die Veränderung der Proteinkonzentrationen von CALR und weiteren Proteinen des UPR-Signalweges (siehe Kapitel 1.4) wurde mittels Western Blot untersucht. Dabei wurde nach einem Protokoll von Towbin et al. (1979) gearbeitet, welches in der Arbeitsgruppe weiter modifiziert worden war.

Die Proben wurden in einem Polyacrylamid-Gel durch Natriumdodecyl-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in Proteinbanden aufgetrennt und durch ein vertikal zum Gel angelegtes elektrisches Feld auf eine Membran aus Nitrozellulose geblottet. Über hydrophobe Wechselwirkungen blieben die Proteine auf der Membran haften. Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung blieb erhalten und die Proteine konnten mithilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden.

#### 2.3.1 Präparation der Proben

Die Proben wurden in einer Menge von 40-80  $\mu$ g Gesamtprotein für den Western Blot genutzt. Für die Quantifizierung und die Vergleichbarkeit der Proben wurden für jeden einzelnen Western Blot gleiche Proteinmengen verwendet. Den Proben wurde die entsprechende Menge Probenpuffer [Trisaminomethan – Salzsäure (HCl) Puffer 125 mM, pH 6,8, SDS 4 % (w/v), Glycerol 20 % (v/v), Bromphenolblau 2 % (v/v), Beta Mercaptoethanol 2 % (v/v)] hinzugegeben und mit ddH<sub>2</sub>O auf 20  $\mu$ l aufgefüllt. Zur Denaturierung wurden die Proben für 10 min bei 96 °C auf einem Kochblock (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg) erhitzt.

# 2.3.2 Anfertigung der Minigele

Die Minigele für die SDS-PAGE wurden nach Laemmli (1970) hergestellt. In zwei Polymerisationsschritten wurden in speziell dafür geeigneten Gießvorrichtungen die Gele produziert. Es wurde ein zehnprozentiges Trenngel (Tabelle 9) in die Vorrichtung gegossen und das Gel mit Butanol überschichtet.

Nachdem die Proben polymerisiert waren, wurde das Butanol abgegossen, ein vierprozentiges Sammelgel (Tabelle 9) eingefüllt und mithilfe eines Kammes zehn Sammeltaschen in das Sammelgel eingebracht.

<u>Trenngel 10 % pH 8,</u>	<u>8</u>	<u>Sammelgel 4 % pH 6,8</u>		
Wasser	21 ml	Wasser	15 ml	
1,5M Tris-HCl pH 8,8	15 ml	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	6,3 ml	
Acrylamid	24 ml	Acrylamid	3,3 ml	
10 min Entgasen				
SDS 10 %	600 µl	SDS 10 %	250 µl	
Ammoniumperoxodisulfat (APS) 10 %	300 µl	APS 10 %	125 µl	
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	30 µl	TEMED	30 µl	

## Tabelle 9: Pipettierschema zur Erstellung der Gele für die SDS-PAGE

Nach vollständiger Polymerisation wurden die fertigen Gele feucht für maximal eine Woche, lichtgeschützt und kühl bei 3-8 °C gelagert.

# 2.3.3 SDS-PAGE

Zur Gelelektrophorese wurden die Proben in die vorgesehenen Geltaschen pipettiert und die Vorrichtung mit Elektrophorese-Puffer [200 ml fünffach konzentrierter Elektrophorese-Puffer (Tris 15 g, Glycerin 72 g, SDS 5 g), 800 ml ddH<sub>2</sub>O] gefüllt. Zusätzlich wurden in einer separaten Geltasche 5 µl Western Blot- Marker aufgetragen. Dann wurde die SDS-PAGE für 10 min bei 180 V und anschließend 50 min bei 200 V durchgeführt.

### 2.3.4 Tankblotting und Blocken der Membran

Wenn die Proben vollständig über das Gel gelaufen waren, wurde das Gel aus der Blotting-Vorrichtung genommen und nach einem definierten Schema (Abbildung 3) in eine Blot-Zelle eingebaut:



Abbildung 3: Blotting-Packschema

Die Nitrozellulosemembran wurde in einfach konzentriertem Transferpuffer [200 ml fünffach konzentrierter Transferpuffer (Glycerin 950 mM, Tris 125 mM, SDS 0,05 % (w/v), Methanol 2 % (v/v)), 200 ml Methanol 98 %, 600 ml ddH<sub>2</sub>O] für 15 min äquilibriert, der Blot daraufhin zusammengesetzt. Beim Zusammensetzen der Blot-Zelle wurden mittels eines Rollstifts Luftblasen zwischen den Sandwichteilen eliminiert. Die Blot-Zelle wurde nach obigem Schema gepackt, in eine Kammer montiert und mit einfach konzentriertem Transferpuffer aufgefüllt. Es wurde bei einer Temperatur von 4 °C entweder 1 h bei 100 V oder über Nacht bei 40 V geblottet.

### 2.3.5 Färbung der Membran mit Ponceau S

Zur Kontrolle des Erfolges des Proteintransfers wurde die Blotting-Membran für eine Minute in Ponceau-S-Lösung gelegt und dann mit 5 % Essigsäure und anschließend mit einfach konzentriertem Waschpuffer [200 ml 5x Waschpuffer (12,11 g Tris, 58,14 g Natriumchlorid, 20 ml Polysorbat Lösung, pH einstellen auf 7,5), 800 ml ddH<sub>2</sub>O] abgespült. Anschließend wurden die Transfer-Ergebnisse beurteilt und dokumentiert. Danach wurde die Blotting-Membran für 10 min getrocknet.

#### 2.3.6 Inkubation mit dem Primärantikörper

Die Blotting-Membran wurde für 2 h bei 37 °C in Blocking-Puffer (5 % Magermilchpulver auf 100 ml 1x Waschpuffer, s.o.) inkubiert. Im Anschluss wurde einmal mit einfach konzentriertem Waschpuffer gewaschen, der erste in Milchpuffer (=Blocking-Puffer) gelöste Antikörper in entsprechender Verdünnung (Tabelle 10) auf die Blotting-Membran pipettiert und dieser bei 4 °C über Nacht inkubiert. Das Magermilchpulver diente zum Absättigen der freien Bindungsstellen. Der Antikörper erkannte dabei den Milchpuffer nicht und band daher auch nicht an ihn.

<u>Antikörper</u>	Verdünnung
ATF6A	1:500
ß-Aktin	1:1500
CALR	1:1000
ERP57	1:1000
GRP78	1:1000
GRP94	1:1000

#### Tabelle 10: Verdünnung des Primärantikörpers

#### 2.3.7 Inkubation mit dem Sekundärantikörper

Um die Membran mit dem Sekundärantikörper zu inkubieren, wurde sie drei Mal für 10 min bei 37 °C gewaschen. Ein Waschgang beinhaltete den Austausch der verwendeten Flüssigkeit mit einfach konzentriertem Waschpuffer. Der zum Host des ersten Antikörpers passende Sekundärantikörper (siehe 2.1.1.3) wurde in Milchpuffer gelöst, in einer Konzentration von 1:2000 der Blotting-Membran zugegeben und für 2 h bei 37 °C unter Schwenken inkubiert. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Membran vor Lichteinstrahlung geschützt. Es erfolgte erneut das dreimalige Waschen der Blotting-Membran. Die Membran wurde im Fluoreszenz-Scanner (FLA 5100, Fujifilm, Shigetaka Komori, Japan) eingelesen. Da wir für den Western Blot einen floureszenzgekoppelten sekundären Antikörper benutzten, konnten wir eine Blotting-Membran für den Nachweis von mehr als nur einem Protein benutzen. Dafür wurde die Membran nach dem ersten Scan kurz gewaschen, dann konnte der nächste Primärantikörper dazugegeben und über Nacht inkubiert werden.

#### 2.3.8 Auswertung der Western Blots

Die als digitale Datei vorliegenden Scans der Membranen wurden mit Image J (Version 1.40, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) nach einem modifizierten Protokoll von Miller (2010) analysiert. Die Banden des Western Blots wurden markiert und ihre Densität errechnet. Die Densität der geblotteten Proteine wurde jeweils gegen den Wert des Referenzproteins  $\beta$ -Aktin (ACTB, *actin beta*) aufgerechnet und gegen die Kontrolle normalisiert. Mithilfe des Einstichproben-t-Tests wurden die Western Blots auf einen signifikanten Unterschied der Proteinregulierungen unter Behandlung mit unterschiedlichen Cisplatin-Konzentrationen zur Kontrolle und damit dem Wert eins überprüft. Unterschiede zwischen den behandelten Zellen (unter 20  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, und 100  $\mu$ M Cisplatin-Behandlung) wurden mittels einfacher ANOVA und anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest nachgewiesen.

#### 2.4 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Bestimmung der Lokalisation von CALR in mit Cisplatin behandelten Zellen wurden Immunfluoreszenzfärbungen von CALR angefertigt. Es wurden Zellen auf 8-Kammer-Objektträgern mit 12.000 Zellen/Kammer und 400 µl Zellmedium/Kammer verteilt, über Nacht inkubiert und mit Cisplatin in den Konzentrationen 20 µM, 50 µM und 100 µM behandelt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und zur Fixierung mit 200 µl Methanol bei -20 °C für 2 h inkubiert. Es folgten zwei Waschgänge mit PBS. Die Permeabilisierung der Zellen wurde für 30 s in einer 0,1 % Triton X in PBS-Lösung durchgeführt. Geblockt wurde mit 100 µl 10 %-igem Ziegenserum für 15 min.

Der Primärantikörper CALR wurde in 100  $\mu$ l 10 %-igem Ziegenserum 1:100 verdünnt, der Lösung hinzugegeben und bei 4 °C über Nacht und bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Es folgte zweimaliges Waschen mit PBS. Die Sekundärantikörper für Ziege der Wellenlänge 555 nm und 488 nm wurden in 100  $\mu$ l 10 %-igem Ziegenserum in der Konzentration 1:1000 unter Ausschluss von Licht auf die Wells gegeben und für 2 h inkubiert. Es folgte erneut zweimaliges Waschen mit PBS.

Für die Färbung mit Diamidinophenylindol (DAPI) wurde dieses in einer 1:1 Verteilung in 100 μl PBS (entspricht 300 μM DAPI) in die Kammern pipettiert und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die DAPI-Lösung wurde abgesaugt, es wurde einmal mit PBS gewaschen und mit Immuno-Mount eingedeckt. Abschließend wurde ein Deckglas auf dem Träger angedrückt und mit Eukitt versiegelt.

Die fixierten und gefärbten Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop (IX-71, Oympus, Hiroyuki Sasa, Japan) betrachtet, analysiert und dokumentiert.

# 2.5 Transfektionen

#### 2.5.1 Transfektion mit Small Interfering Ribonucleic Acid (siRNA)

Zum Knockdown von CALR wurden die Zellen mit *small interfering ribonucleic acid* (siRNA) behandelt, die eine CALR-Sequenz enthielt. Die siRNA bindet an eine spezifische Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA, *messenger ribonucleic acid*)-Gensequenz und verhindert deren Ablesen, sodass das Zielprotein verringert exprimiert wird.

Die siRNA-Transfektion wurde unter sterilen Bedingungen in 75-ml-Zellschalen durchgeführt. Das Zellmedium wurde für Caki-2-Zellen eine Stunde vor der Transfektion gegen 7 ml Opti-MEM (Hungermedium) und für A498-Zellen gegen 7 ml FCS-freies modifiziertes DMEM-Medium (2.2.1) getauscht. Zur Transfektion wurden 300 pM CALR-siRNA 437 (sense strand: 5'-GACAGACAUGCACGGAGACUCAGAAUA-3', antisense strand: 5'-U-AUUCUGAGUCUCCGUGCAUGUCUGUC-3') und 300 pM CALR-siRNA 1190 (sense strand: CUCUUUGCGUUUCUUGUCUUCC-3') in einem Zentrifugenröhrchen mit 1,5 ml Opti-MEM und in einem separaten Zentrifugenröhrchen 30 µl Lipofectamin mit 1,5 ml Opti-MEM für jeweils 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt der Röhrchen vermischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch mit siRNA und Lipofectamin wurde den Zellschalen zugegeben, sodass mit einer Konzentration von 30 pM/ml der jeweiligen siRNA behandelt wurde. Bei Caki-2-Zellen ließ man die Transfektion über Nacht inkubieren und tauschte dann das Opti-MEM gegen normales Zellmedium, bei A498 wurde das Transfektionsmedium nach 8 h gewechselt.

Zur Kontrolle wurde eine Kulturfalsche jeweiligen Zelltyps nach gleichem Transfektionsschema mit *non-specific-siRNA* (NSC siehe Kapitel 2.1.1.4, *sense strand*: 5'-UC-CAUCACAUUAGCGGAAC-3', *antisense strand*: 5'-GUUCCGCUAAUGUGAUGGA-3'), einer siRNA ohne Bindung zu einer humanen mRNA, behandelt.

Der Erfolg der Transfektion wurde mittels Western Blot nachgewiesen.

#### 2.5.2 Transfektion mit Plasmid

Zur Überexprimierung von CALR wurde ein Plasmid mit eingebauter CALR-Primer-Sequenz (*sense strand*: 5'-AAGCTTGAATTCCCTCGGCCCGCCATGCTCCTT TCGGTG CCGCTC-3', *antisense strand*: 5'-CATAGCACGCGTTGATGTATCCTCTTCACCAG-3'), welches bereits von Dr. Phuc Nguyen konstruiert worden war (Bibi et al. 2011), in die Zelle eingebracht, sodass das Protein vermehrt exprimiert wurde.

Die Transfektion wurde unter sterilen Bedingungen in 3 ml-Kulturschalen durchgeführt. Die Schalen wurden mit 2 ml Opti-MEM für eine Stunde vorbehandelt. Es wurden 500 µl Opti-MEM mit 2 µg Plasmid und separat 500 µl Opti-MEM mit 10 µl Lipofectamin für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die beiden Inhalte vermischt, für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann in die vorbehandelte Kulturflasche gegeben und abschließend bei A498-Zellen für 8 h, bei Caki-2-Zellen über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nachdem die Inkubation abgeschlossen war, wurde das Opti-MEM gegen normales Zellmedium gewechselt.

Der Erfolg der Transfektion wurde mittels Western Blot nachgewiesen.

### 2.6 Zell-Viabilitäts-Assay/MTT-Test

Um den Effekt von Cisplatin bzw. CALR-Expressionsregulierung auf die Proliferation von Zellen zu überprüfen, wurde ein Zell-Viabilitäts-Assay/MTT-Test durchgeführt. Dieser basiert auf der Reaktion von gelbfarbenem Dimethythiazoldiphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu violettem Dimethylthiazoldiphenylformazan (Formazan). Bei der Reaktion entstehen violette Formazan-Kristalle, diese können gelöst und die gefärbte Lösung im Multiwell-Spectrophotometer [*enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)- Reader] quantifiziert werden. Die Reaktion von MTT zu Formazan läuft in metabolisch aktiven Zellen ab, weshalb sie sich zur Bestimmung der Proliferation von Zellen eignet.

Zellen wurden auf 96-Well-Platten nach festem Schema mit 5.000 Zellen/Well verteilt und über Nacht mit 200 µl Kulturmedium inkubiert. Es folgte die Behandlung mit Cisplatin über 48 h. Im Anschluss wurde der Proliferations-Assay angesetzt. Die Wells wurden entleert und mit 100 µl Zellmedium und 10 µl MTT-Labeling-Reagens versetzt. Nach 4 h Inkubationszeit wurde 100 µl Solubilisations-Lösung hinzugegeben und das Gemisch über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde bei 550 nm im ELISA-Reader (iMark microplate reader, Bio-Rad, München) ausgelesen. In einem gesonderten Versuch wurden Zellen nach Inkubation über Nacht in 96-Well-Platten für 24 h mit 5 µM TM behandelt. Anschließend erfolgte die Behandlung mit Cisplatin und daraufhin der Viabilitäts-Assay nach gleichem Schema. Jedes Experiment wurde mit mindestens zwei 96-Well-Platten durchgeführt.

Die ausgegebenen Werte wurden für jede Behandlungskonzentration von Cisplatin gemittelt und als Prozent zur Kontrollgruppe angegeben. Die Auswertung der MTT-Tests erfolgte mit zweifacher ANOVA und anschließendem multiplem Vergleichstest von Sidak.

### 2.7 Annexin-V-FITC-Assay/Durchflusszytometrie

Die Apoptoserate von mit Cisplatin behandelten Zellen wurde mit einem Annexin V/FITC (Fluoreszenzinisothiocyanat)-Assay bestimmt.

Der Annexin V/FITC-Assay basiert auf einer Färbung von Zellen mit Annexin V und Propidiumiodid (PI). Annexin V bindet an Phosphatidylserin, was von der Zelle bei beginnender Apoptose an die extrazelluläre Seite der Zellmembran translokiert wird. PI hingegen gelangt bei fortgeschrittener Apoptose oder Nekrose durch die perforierte Zellmembran in die Zelle. Die markierten Zellen können anschließend mittels Durchflusszytometrie gezählt werden und der Prozentsatz an Annexin V-positiven, PIpositiven und Annexin V/PI-positiven Zellen angegeben werden

Zellen wurden in 6-Well-Platten verteilt, 30.000 Zellen/Well für A498 und 180.000 Zellen/Well für Caki-2 und mit 2 ml Medium/Well über Nacht inkubiert. Anschließend wurde für 24 h mit Cisplatin in aufsteigenden Konzentrationen (siehe Kapitel 2.2.3) behandelt. Nach Ablauf von 24 h wurde der Assay angesetzt. Dabei wurde zunächst das Zellmedium für jede Konzentration einzeln abgesaugt und in entsprechende Röhrchen überführt. Diese wurden für drei Minuten bei 1100 rpm und 4 °C zentrifugiert. Währenddessen wurden die Wells mit Trypsin behandelt, um die Zellen von den Wells zu lösen. Die Reaktion wurde nach 2 min unter mikroskopischer Kontrolle mit FCS gestoppt. Im Anschluss wurde für 3 min bei 1100 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden dem Pellet 200 µl Annexin-Bindepuffer (ABB, annexin binding buffer), der zuvor im Verhältnis 1:5 verdünnt worden war, zugefügt. Das Gemisch wurde in Falcon-Röhrchen überführt, mit 5 µl Annexin V/FITC und 1 µl Gemisch aus PI und ABB im Verhältnis 1:10 versetzt und für 10-15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden jedem Röhrchen 400 µl ABB hinzugefügt und die Proben im Durchflusszytometer (FACS Canto 2, BD Biosciences, Franklin Lakes, NY, USA) gemessen. Die Auswertung erfolgte analog der MTT-Tests mit zweifacher ANOVA und anschließendem multiplen Vergleichstest von Sidak.

# 3 Ergebnisse

# 3.1 Einfluss der Cisplatin-Behandlung auf das Überleben von RCC-Zelllinien

Die lichtmikroskopische Analyse (Mikroskop: Axiovert 200, Zeiss, Oberkochen) von A498und Caki-2-Zellen unter Cisplatin-Behandlung zeigt eine konzentrationsabhängige Zunahme der Apoptoserate in beiden Zelllinien (Abbildung 4 und Abbildung 5). Sichere Anzeichen für das Einsetzen von Apoptose sind im Umfang deutlich verminderte und vom Flaschenboden gelöste Zellen. Weiterhin nimmt die Proliferationsrate der Zellen mit steigenden Cisplatin-Konzentrationen ab, wie an einer verminderten Zelldichte von behandelten Zellen zu erkennen ist. Morphologische Unterschiede von A498 zu Caki-2 bestehen in der Zellgröße, dem Wachstumsverhalten und der Wachstumsrate. A498-Zellen sind deutlich größere Zellen und wachsen mit zellulären Ausläufern. Caki-2-Zellen sind kleinere Zellen, die in zellulären Verbänden wachsen. Unterschiede in der Reaktion auf die Cisplatin-Behandlung zeigten sich in einer unterschiedlichen Proliferations- und Apoptoserate der beiden Zelllinien (quantitative Analysen folgen in Abschnitt 3.6, 3.7 und 3.8.).



#### Abbildung 4: Lichtmikroskopische Analyse von A498-Zellen unter Cisplatin-Behandlung

A498-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cisplatin behandelt, dargestellt je in einer Spalte (gekennzeichnet mit:  $a = 0 \mu M$ ,  $b = 20 \mu M$ ,  $c = 50 \mu M$  und  $d = 100 \mu M$ ) der Abbildung. Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen gemacht, dargestellt in den Zeilen der Bildtabelle (I = 0h, II = 24h, III = 48h). Vergrößerung: 100-fach


#### Abbildung 5: Lichtmikroskopische Analyse von Caki-2-Zellen unter Cisplatin-Behandlung

Caki-2-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cisplatin behandelt, dargestellt je in einer Spalte (gekennzeichnet mit:  $a = 0 \mu M$ ,  $b = 20 \mu M$ ,  $c = 50 \mu M$  und  $d = 100 \mu M$ ) der Abbildung. Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen gemacht, dargestellt in den Zeilen der Bildtabelle (I = 0h, II = 24h, III = 48h). Vergrößerung: 100-fach

## 3.2 Lokalisation von CALR in RCC-Zelllinien unter Cisplatin-Behandlung

Immunfluoreszenzfärbungen von CALR in den RCC-Zelllinien A498 (Abbildung 6) und Caki-2 (Abbildung 7) zeigen die zelluläre Lokalisation von CALR in den Zelllinien unter der Behandlung mit Cisplatin in ansteigenden Konzentrationen. Außerdem werden die Erkenntnisse aus Kapitel 3.1 bestätigt. Mit steigender Behandlungskonzentration von Cisplatin nimmt der Umfang der Zellen als Zeichen beginnender Apoptose ab und die Proliferationsrate der Zellen sinkt im Vergleich zur Kontrolle.

In A498-Zellen lässt sich eine vorwiegende Lokalisation von CALR um den Zellkern herum vermuten. Bei Behandlung mit niedrigen Cisplatin-Konzentrationen (20 µM) scheint sich dieser Effekt zu verstärken. Eine Behandlung mit höheren Konzentrationen von Cisplatin resultiert in einer schwächeren Anfärbung von Calretikulin.

Caki-2-Zellen zeigen ebenfalls eine perinukleäre Anreicherung von CALR unabhängig von der Behandlung mit Cisplatin. Zudem ändert sich das Wachstumsverhalten der Zellen. Caki-

2-Zellen der Kontrollgruppe wachsen in zellulären Verbänden gruppiert, während unter Cisplatin-Behandlung diese Ordnung verloren geht.



Abbildung 6: Immunfluoreszenzfärbung von CALR in A498-Zellen unter Cisplatin-Behandlung

Cisplatin-Konzentrationen: 0  $\mu$ M (I), 20  $\mu$ M (II), 50  $\mu$ M (III) und 100  $\mu$ M (IV). CALR grün, DAPI blau. Vergrößerung: 100-fach und 400-fach (Marker zeigt 50  $\mu$ m)



#### Abbildung 7: Immunfluoreszenzfärbung von CALR in Caki-2-Zellen unter Cisplatin-Behandlung

Cisplatin-Konzentrationen: 0  $\mu$ M (I), 20  $\mu$ M (II), 50  $\mu$ M (III) und 100  $\mu$ M (IV). CALR grün, DAPI blau. Vergrößerung: 100-fach und 400-fach (Marker zeigt 50  $\mu$ m)

## 3.3 Einfluss der Behandlung mit Cisplatin auf die Regulierung von ER-Stressproteinen in RCC-Zelllinien

Die Auswirkungen der Cisplatin-Behandlung auf die Expressionsregulierung der ER-Stressproteine und der Proteine des UPR-Signalweges in RCC-Zellen sind in Abbildung 8 bis Abbildung 13 dargestellt. Es wurden fünf verschiedene Proteine überprüft, die wichtige Chaperone des ER (CALR, GRP78, GRP94 und ERP57) und Bestandteil des UPR-Signalweges (ATF6A) sind (für genauere Informationen siehe Kapitel 1.4).

Zur Quantifizierung der Expressionsregulierung von CALR unter Cisplatin-Behandlung wurde ein monoklonaler Antikörper gegen CALR verwendet. Die Proteinbeladungskontrolle wurde mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen ACTB durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt. In A498-Zellen zeigt sich keine wesentliche Veränderung in der CALR-Expression (20  $\mu$ M zur Kontrolle: 1.088 +/- 0.4881, p = 0.6788; 50  $\mu$ M zur Kontrolle: Mittelwert 1.209 +/- 1.053, p = 0.6468, 100  $\mu$ M zur Kontrolle: Mittelwert 0.8823 +/- 0.4858, p = 0.5787). In Caki-2-Zellen ist ein nicht signifikanter Anstieg der CALR-

Expression mit steigender Behandlungskonzentration von Cisplatin erkennbar (20  $\mu$ M zur Kontrolle: 1.099 +/- 0.6439, p = 0.7211; 50  $\mu$ M zur Kontrolle: Mittelwert 1.236 +/- 0.7308, p = 0.4640). Bei Behandlung mit hohen Konzentrationen von Cisplatin zeigt sich eine nicht signifikante Hochregulierung von CALR (100  $\mu$ M zur Kontrolle, Mittelwert und Standardabweichung 1.848 +/- 1.193, p = 0.1422, Abbildung 8).



## Abbildung 8: Western-Blot-Analyse und Quantifizierung der CALR-Expressionslevel in A498- und Caki-2-Zelllinien unter Cisplatin-Behandlung

Dargestellt sind repräsentative Western Blots (linke Hälfte) von CALR und der Positivkontrolle ACTB mit den entsprechenden Auswertungen (rechte Hälfte) in RCC-Zellen (A: A498, B: Caki-2), die mit aufsteigenden Cisplatin-Konzentrationen behandelt wurden. Angabe der zur Kontrolle normalisierten Werte als **Mittelwert mit Standardabweichung**. Signifikante Unterschiede von jeder Behandlungskonzentration zum normalisierten Wert 1 sind direkt über der jeweiligen Säule eingetragen, Unterschiede zwischen den Konzentrationen als Balken. Signifikanzniveaus: \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001. Zur statistischen Auswertung der Western Blots, siehe Kapitel 2.3.8.

Die Regulierung des zentralen ER-Chaperons GRP78 wurde mit einem polyklonalen Antikörper nach gleichem Vorgehen überprüft und ist in Abbildung 9 abgebildet. Hier zeigt sich ein gegenläufiger Trend von A498 und Caki-2. In A498-Zellen zeigt GRP78 eine nicht signifikante Hochregulierung bei Behandlung mit niedrigen Konzentrationen von Cisplatin (20  $\mu$ M zur Kontrolle: Mittelwert 1.279 +/- 0.6525, p = 0.3928, Abbildung 9), bei Behandlung mit hohen Konzentrationen Cisplatin zeigt sich eine ebenfalls nicht signifikante Herunterregulierung (100  $\mu$ M zur Kontrolle: 0.6758 +/- 0.4942, p = 0.2162, Abbildung 9). In Caki-2-Zellen steigt die GRP78-Regulierung mit steigenden Cisplatin-Konzentrationen. Bei Behandlung mit hohen Cisplatin-Konzentrationen ist GRP78 gegenüber der Kontrolle signifikant hochreguliert (100  $\mu$ M zur Kontrolle, Mittelwert 1.687 +/- 0.5583, p = 0.0173, Abbildung 9).



## Abbildung 9: Western-Blot-Analyse und Quantifizierung der Expressionslevel von GRP78 in A498- und Caki-2-Zelllinien unter Cisplatin-Behandlung

Dargestellt sind repräsentative Western Blots (linke Hälfte) von GRP78 und der Positivkontrolle ACTB mit den entsprechenden Auswertungen (rechte Hälfte) in RCC-Zellen (A: A498, B: Caki-2), die mit aufsteigenden Cisplatin-Konzentrationen behandelt wurden. Angabe der zur Kontrolle normalisierten Werte als **Mittelwert mit Standardabweichung**. Signifikante Unterschiede von jeder Behandlungskonzentration zum normalisierten Wert 1 sind direkt über der jeweiligen Säule eingetragen, Unterschiede zwischen den Konzentrationen als Balken. Signifikanzniveaus: \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001. Zur statistischen Auswertung der Western Blots, siehe Kapitel 2.3.8.

Ein weiteres zentrales Chaperon des ER, GRP94, wurde untersucht. GRP94 ist in A498-Zellen bei Behandlung mit niedrigen und mittleren Konzentrationen von Cisplatin zunächst hochreguliert (20  $\mu$ M zur Kontrolle: 2.399 +/- 0.8904, p = 0.006; 50  $\mu$ M zur Kontrolle: 1.891 +/- 0.8935, p = 0.0386, Abbildung 10) und fällt mit steigender Konzentration von Cisplatin wieder auf ähnliche Werte der Kontrolle (100  $\mu$ M zur Kontrolle: 1.316 +/- 0.8648, p = 0.3706, Abbildung 10). Unterschiede der Regulierung zwischen den Behandlungskonzentrationen sind ebenfalls signifikant (20  $\mu$ M zu 100  $\mu$ M: p < 0.01, 50  $\mu$ M zu 100  $\mu$ M: p< 0.05, Abbildung 10). In Caki-2-Zellen zeigt sich eine konzentrationsabhängige Steigerung der GRP94-Regulierung. Für GRP94 besteht eine Hochregulierung bei Behandlung mit hohen Konzentrationen Cisplatin. Diese ist aber nicht statistisch signifikant (100  $\mu$ M zur Kontrolle: Mittelwert 1.976 +/- 0.8928, p = 0.0709, Abbildung 10).



#### Abbildung 10: Western-Blot-Analyse und Quantifizierung der Expressionslevel von GRP94 in A498- und Caki-2-Zelllinien unter Cisplatin-Behandlung

Dargestellt sind repräsentative Western Blots (linke Hälfte) von GRP94 und der Positivkontrolle ACTB mit den entsprechenden Auswertungen (rechte Hälfte) in RCC-Zellen (A: A498, B: Caki-2), die mit aufsteigenden Cisplatin-Konzentrationen behandelt wurden. Angabe der zur Kontrolle normalisierten Werte als **Mittelwert mit Standardabweichung**. Signifikante Unterschiede von jeder Behandlungskonzentration zum normalisierten Wert 1 sind direkt über der jeweiligen Säule eingetragen, Unterschiede zwischen den Konzentrationen als Balken. Signifikanzniveaus: \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001. Zur statistischen Auswertung der Western Blots, siehe Kapitel 2.3.8.

Die Veränderung der Regulierung von ERP57, dem zentralen Co-Chaperon von CALR, ist in Abbildung 11 dargestellt (zur Funktion von ERP57 siehe Kapitel 1.4). ERP57 in A498-Zellen zeigt für jede Behandlungskonzentration von Cisplatin eine Hochregulierung, die jedoch verglichen zur Kontrolle statistisch nicht signifikant ist (20 µM zur Kontrolle: Mittelwert 2.606 +/- 2.570, p = 0.3923; 50  $\mu$ M zur Kontrolle: Mittelwert 1.616 +/- 1.049, p = 0.416; 100  $\mu$ M zur Kontrolle: Mittelwert 1.768 +/- 0.5754, p = 0.147, Abbildung 11). In Caki-2-Zellen zeigt sich eine konzentrationsabhängige Erhöhung der ERP57-Expression mit gegenüber der Kontrolle signifikant unterschiedlichen Werten bei Behandlung mit 100  $\mu$ M Cisplatin (100  $\mu$ M zur Kontrolle: Mittelwert 1.542 +/- 0.4788, p = 0.0393, Abbildung 11).



## Abbildung 11: Western-Blot-Analyse und Quantifizierung der Expressionslevel von ERP57 in A498- und Caki-2-Zelllinien unter Cisplatin-Behandlung

Dargestellt sind repräsentative Western Blots (linke Hälfte) von ERP57 und der Positivkontrolle ACTB mit den entsprechenden Auswertungen (rechte Hälfte) in RCC-Zellen (A: A498, B: Caki-2), die mit aufsteigenden Cisplatin-Konzentrationen behandelt wurden. Angabe der zur Kontrolle normalisierten Werte als **Mittelwert mit Standardabweichung**. Signifikante Unterschiede von jeder Behandlungskonzentration zum normalisierten Wert 1 sind direkt über der jeweiligen Säule eingetragen, Unterschiede zwischen den Konzentrationen als Balken. Signifikanzniveaus: \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001. Zur statistischen Auswertung der Western Blots, siehe Kapitel 2.3.8.

ATF6A wurde in dieser Arbeit mittels eines monoklonalen Antikörpers nachgewiesen, der an beide Formen des Proteins bindet, die inaktive 90-kDa-Einheit (p90) und die aktive 50kDa-Untereinheit. Beide Einheiten wurden ausgewertet und sind in Abbildung 12 und Abbildung 13 dargestellt. Das für A498-Zellen vorliegende Ergebnis zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Regulierung, bei fehlender statistischer Aussage bei einem vorliegenden Ergebnis. Das Protein ließ sich an dieser Stelle nicht ausreichend anfärben, wahrscheinlich bedingt durch eine unzureichende Bindung des Primärantikörpers an das Protein in den Experimenten.

In Caki-2-Zellen liegen signifikant herunterregulierte Werte für die inaktive 90-kDa-Einheit vor, die mit steigender Behandlungskonzentration von Cisplatin noch weiter abfallen (20  $\mu$ M zur Kontrolle: 0.3117 +/- 0.02111, p = 0.0138; 50  $\mu$ M zur Kontrolle: Mittelwert 0.1395 +/- 0.044, p = 0.023, 100  $\mu$ M zur Kontrolle: Mittelwert 0.1814 +/- 0.02812, p = 0.0155, Abbildung 12). Unterschiede der Regulierung zwischen niedrigen und hohen Behandlungskonzentrationen sind ebenfalls signifikant (20  $\mu$ M zu 100  $\mu$ M: p < 0.05).



#### Abbildung 12: Western-Blot-Analyse und Quantifizierung der Expressionslevel der ATF6Ap90-Einheit in A498- und Caki-2-Zelllinien unter Cisplatin-Behandlung

Dargestellt sind repräsentative Western Blots (linke Hälfte) von ATF6A p90 und der Positivkontrolle ACTB mit den entsprechenden Auswertungen (rechte Hälfte) in RCC-Zellen (A: A498, B: Caki-2), die mit aufsteigenden Cisplatin-Konzentrationen behandelt wurden. Angabe der zur Kontrolle normalisierten Werte als **Mittelwert mit Standardabweichung**. Signifikante Unterschiede von jeder Behandlungskonzentration zum normalisierten Wert 1 sind direkt über der jeweiligen Säule eingetragen, Unterschiede zwischen den Konzentrationen als Balken. Signifikanzniveaus: \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001. Zur statistischen Auswertung der Western Blots, siehe Kapitel 2.3.8.

Die p50-Untereinheit von ATF6A wurde wie oben dargestellt ebenfalls untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt. In A498-Zellen zeigt sich bei Behandlung mit niedrigen Konzentrationen Cisplatin zunächst eine nicht signifikante Hochregulierung

(20  $\mu$ M zur Kontrolle: 1.547 +/- 1.087, p = 0.2724), bei Behandlung mit höheren Konzentrationen eine Herunterregulierung, für die Behandlung mit 50  $\mu$ M signifikant zur Kontrolle (50  $\mu$ M zur Kontrolle: Mittelwert 0.6485 +/- 0.2833, p = 0.0288; 100  $\mu$ M zur Kontrolle: Mittelwert 0.7898 +/- 0.5545, p = 0.3958, Abbildung 13).

In Caki-2-Zellen zeigt die Behandlung mit Cisplatin in unterschiedlichen Konzentrationen keine Unterschiede in der Regulierung von ATF6A p50 zur unbehandelten Kontrollgruppe (20  $\mu$ M zur Kontrolle: 1.005 +/- 0.6319, p = 0.9846; 50  $\mu$ M zur Kontrolle: Mittelwert 0.8346 +/- 0.3876, p = 0.3020, 100  $\mu$ M zur Kontrolle: Mittelwert 0.8684 +/- 0.2901, p = 0.2754, Abbildung 13).



#### Abbildung 13: Western-Blot-Analyse und Quantifizierung der Expressionslevel der ATF6Ap50-Untereinheit in A498- und Caki-2-Zelllinien unter Cisplatin-Behandlung

Dargestellt sind repräsentative Western Blots (linke Hälfte) von ATF6A p50 und der Positivkontrolle ACTB mit den entsprechenden Auswertungen (rechte Hälfte) in RCC-Zellen (A: A498, B: Caki-2), die mit aufsteigenden Cisplatin-Konzentrationen behandelt wurden. Angabe der zur Kontrolle normalisierten Werte als **Mittelwert mit Standardabweichung**. Signifikante Unterschiede von jeder Behandlungskonzentration zum normalisierten Wert 1 sind direkt über der jeweiligen Säule eingetragen, Unterschiede zwischen den Konzentrationen als Balken. Signifikanzniveaus: \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001. Zur statistischen Auswertung der Western Blots, siehe Kapitel 2.3.8.

### 3.4 Regulierung von ER-Stressproteinen in RCC-Zellen unter Behandlung mit Tunicamycin (TM)

In der vorliegenden Arbeit sollte neben dem Einfluss von CALR bei der Resistenz gegenüber Chemotherapie mit Cisplatin in einem weiteren Versuch der kombinierte Einfluss von mehreren ER-Stressproteinen in diesem Resistenzprozess untersucht werden. Zur Induktion von ER-Stress und Regulierung von ER-Stressproteinen wurden die RCC-Zellen mit Tunicamycin (TM) behandelt. In einem ersten Schritt wurde der Erfolg der ER-Stressinduktion über die Expressionslevel der ER-Stressproteine mittels Western Blot untersucht.

Im Rahmen früherer Arbeiten, die innerhalb der Arbeitsgruppe von Prof. Dihazi durchgeführt wurden, wurde gezeigt, dass sowohl humane Zelllinien des proximalen Tubulus, als auch Zelllinien humaner Fibroblasten mit einer signifikanten Hochregulierung von ER-Stressproteinen und Aktivierung des UPR-Signalwegs auf TM-Behandlung reagieren (Dihazi et al. 2013). Im Gegensatz zu gesunden Nierenzellen, reagieren die RCC-Zelllinien anders: Sowohl die Expression von CALR als auch die der anderen ER-Stress Proteine zeigen keine signifikante Hochregulierung unter TM (Abbildung Anhang 1).

Tunicamycin gehört zu den Nukleosid-Antibiotika und hemmt die n-terminale Glykosylierung, was zur Akkumulation von ungefalteten Proteinen und zu ER-Stress führt. Die nicht signifikante Wirkung von TM in RCC-Zelllinien könnte an der möglichen geringen Bedeutung der n-terminalen Glykosylierung in der Proliferation von RCC-Zelllinien liegen.

#### 3.5 Veränderung der Expression von CALR in RCC-Zellen

Um in weiteren Versuchen (siehe Kapitel 3.6 und 3.8) die Rolle von CALR in der Proliferations- und Apoptoserate von RCC-Zellen unter Behandlung mit Cisplatin zu untersuchen, wurden Zelllinien mit Hoch- und Herunterregulierung von CALR etabliert (zur Methode siehe Kapitel 2.5). Ergebnisse der Transfektionen sind in Abbildung 14 dargestellt: Bei Caki-2-Zellen wurde eine signifikante Herunterregulierung von CALR mittels siRNA-Transfektion (siRNA zur Kontrolle: Mittelwert 0.2042 +/- 0.09739, p < 0.0001) und ebenfalls eine signifikante Hochregulierung von CALR durch Plasmid-Transfektion (Plasmid zur Kontrolle: Mittelwert 1.884 +/- 0.4136, p = 0.0235) erreicht. In A498-Zellen sind die Effekte geringer ausgeprägt und statistisch nicht signifikant (siRNA zur Kontrolle: Mittelwert 0.6294 +/- 0.04385, p= 0.058; Plasmid zur Kontrolle: Mittelwert 1.161, weitere Aussagen aufgrund eines einzelnen Werts nicht möglich).



Abbildung 14: Western-Blot-Analyse zur Erfolgskontrolle der Transfektionen

Repräsentative Western-Blot-Analysen sind im oberen Abschnitt dargestellt, die Auswertung in der Spalte darunter. Die Proben wurden gegen ACTB aufgerechnet und als normalisierte Werte zur Kontrolle angegeben (analog Abbildung 8). Signifikante Unterschiede von jeder Behandlungskonzentration zu dem Wert 1 (dem Wert der Kontrolle, da die Proben normalisiert wurden) sind direkt über der jeweiligen Säule eingetragen. Signifikanzniveaus sind wie folgt angegeben: \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001. Zur statistischen Auswertung der Western Blots, siehe Kapitel 2.3.8.

# 3.6 Einfluss der CALR-Expressionsregulierung auf die Proliferation von RCC-Zellen unter Cisplatin-Behandlung

RCC-Zelllinien mit veränderter CALR-Regulierung wurden auf ihre Proliferationsrate unter Therapie mit Cisplatin in unterschiedlichen Konzentrationen überprüft und mit einer Kontrollgruppe gleichen Zelltyps mit unveränderter CALR-Regulierung verglichen.

Abbildung 15 zeigt die Proliferationsrate von A498- und Caki-2-Zellen mit herunterreguliertem CALR im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe. Für beide Zellreihen besteht unabhängig von der CALR-Regulierung eine Abnahme der Proliferationsrate mit steigender Behandlungskonzentration von Cisplatin.

A498-Zellen zeigen keine Unterschiede in der Proliferationsrate von Zellen mit unveränderter CALR-Regulierung gegenüber Knockdown-CALR-Zellen, wenn mit niedrigen Konzentrationen von Cisplatin behandelt wurde (20  $\mu$ M Knockdown-CALR zur Kontrolle, Mittelwerte mit Standardabweichung: 70.4 +/- 26.26 zu 76.9 +/- 14.12, Abbildung 15). Für mittlere und höhere Konzentrationen besteht ebenfalls kein Unterschied in der Proliferationsrate von A498-Zellen mit Knockdown-CALR gegenüber der Kontrolle (50  $\mu$ M Knockdown-CALR zur Kontrolle: 57.98 +/- 23.04 zu 55.27 +/- 23.73; 100  $\mu$ M Knockdown-CALR zur Kontrolle: 57.98 +/- 23.04 zu 55.27 +/- 23.73; 100  $\mu$ M Knockdown-CALR zur Kontrolle: 57.98 +/- 18.65, Abbildung 15).

Die Proliferationsrate von Caki-2-Zellen unter Behandlung mit niedrigen Konzentrationen von Cisplatin weist einen nicht signifikanten Unterschied zwischen Zellen mit unveränderter CALR-Regulierung und Caki-2-Zellen mit Knockdown-CALR auf (20  $\mu$ M Knockdown-CALR zur Kontrolle: 57.96 +/- 23.09 zu 40.96 +/- 23.33, keine statistische Signifikanz, Abbildung 15). Bei Behandlung mit höheren Cisplatin-Konzentrationen ist dieser Unterschied geringer und ebenfalls nicht statistisch signifikant (50  $\mu$ M Knockdown-CALR zur Kontrolle: 31.71 +/- 15.72 zu 26.47 +/- 19.87; 100  $\mu$ M Knockdown-CALR zur Kontrolle: 24.79 +/- 11.87 zu 21.39 +/- 15.82, beides statistisch nicht signifikant unterschiedlich, Abbildung 15).



## Abbildung 15: Einfluss von CALR-Herunterregulierung auf die Proliferation von RCC-Zellen unter Cisplatin-Behandlung

Aufgetragen sind die zur unbehandelten (0  $\mu$ M Cisplatin) Kontrollgruppe (Knockdown-CALR und Kontrollzellen) in Prozent angegebenen Ergebnisse des MTT-Tests von RCC-Zellen beider Zelllinien (A: A498, B: Caki-2) mit unveränderter CALR-Regulierung und Knockdown-CALR. Die Versuchsergebnisse sind als **Mittelwert mit Standardabweichung** angegeben. Signifikanzniveaus: \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,001

Abbildung 16 veranschaulicht die Proliferationsrate von RCC-Zelllinien mit hochreguliertem CALR gegenüber Zellen mit unveränderter CALR-Regulierung. Sowohl für A498-Zellen als auch für Caki-2-Zellen besteht eine konzentrationsabhängige Abnahme der Proliferationsrate unter Cisplatin-Behandlung. Die Ergebnisse der Proliferationstests sind immer in Prozent angegeben.

A498-Zellen zeigen in der Gruppe mit unveränderter CALR-Regulierung eine nicht signifikant höhere Proliferationsrate gegenüber Zellen mit hochreguliertem CALR. Bei Behandlung mit niedrigen Konzentrationen von Cisplatin ist dieser Unterschied stärker ausgeprägt (20  $\mu$ M CALR-Hochregulierung zur Kontrolle: 49.22 +/- 16.46 zu 75.02 +/- 13.83, keine statistische Signifikanz, Abbildung 16), bei mittlerer Konzentration von Cisplatin sind die Unterschiede der Proliferationsrate zwischen den Gruppen weniger deutlich (50  $\mu$ M CALR-Hochregulierung zur Kontrolle: 40.59 +/- 17.82 zu 51.76 +/- 22.74, keine statistische Signifikanz, Abbildung 16), bis zur Behandlung mit hohen Konzentrationen, bei der fast kein Unterschied zwischen den Gruppen besteht (100  $\mu$ M CALR-Hochregulierung zur Kontrolle: 36.08 +/- 19.31 zu 42.84 +/- 19.29, nicht signifikant, Abbildung 16).

Die Proliferationsrate von Caki-2-Zellen mit hochreguliertem CALR ist unter Behandlung mit Cisplatin in niedrigen Konzentrationen signifikant höher als die Proliferationsrate von Zellen mit unveränderter CALR-Regulierung (20  $\mu$ M CALR-Hochregulierung zur Kontrolle: 78.06 +/- 14.56 zu 40.96 +/- 23.33, p<0.05, Abbildung 16). Der Unterschied bei Behandlung mit 50  $\mu$ M Cisplatin ist weniger stark ausgeprägt und statistisch nicht mehr signifikant (50  $\mu$ M CALR-Hochregulierung zur Kontrolle: 49.15 +/- 17.81 zu 26.47 +/- 19.87, statistisch nicht signifikant) und bei Behandlung mit 100  $\mu$ M Cisplatin zeigen die Gruppen einen geringen, nicht signifikanten Unterschied in der Proliferationsrate (100  $\mu$ M CALR-Hochregulierung zur Kontrolle: 34.65 +/- 24.47 zu 21.39 +/- 15.82, statistisch nicht signifikant, Abbildung 16).



## Abbildung 16: Einfluss der CALR-Hochregulierung auf die Proliferation von RCC-Zellen unter Cisplatin-Behandlung

Aufgetragen sind die zur unbehandelten (0  $\mu$ M Cisplatin) Kontrollgruppe (CALR-Hochregulierung und Kontrollzellen) in Prozent angegebenen Ergebnisse des MTT-Tests von RCC-Zellen beider Zelllinien (A: A498, B: Caki-2) mit unveränderter CALR-Regulierung und CALR-Hochregulierung. Die Versuchsergebnisse sind als **Mittelwert mit Standardabweichung** angegeben. Signifikanzniveaus: \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001

## 3.7 Proliferation von RCC-Zellen mit hochregulierten ER-Stressproteinen

Die Proliferationsrate von RCC-Zellen mit hochregulierten ER-Stressproteinen unter Cisplatin-Behandlung wurde mittels MTT-Tests in A498 und Caki-2 Zelllinien gemessen, die zunächst mit 5 µM TM und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen von Cisplatin behandelt worden waren. Der Vorversuch dieses Versuchs zeigte keine signifikante Hochregulierung von ER-Stressproteinen (siehe Kapitel 3.4). Aus diesem Grund sind die Ergebnisse im Anhang (Abbildung Anhang 2) dargestellt.

A498-Zellen, die mit TM vorbehandelt wurden, zeigen bei Behandlung mit niedrigen Konzentrationen an Cisplatin keinen signifikanten Unterschied zu Kontrollzellen (ohne TM-Vorbehandlung; 20  $\mu$ M Cisplatin: TM zur Kontrolle: 69.67 +/- 34.03 zu 75.69 +/- 16.17, kein statistisch signifikanter Unterschied, Abbildung Anhang 2). Bei Behandlung mit höheren Konzentrationen von Cisplatin zeigen Zellen mit TM-Vorbehandlung eine höhere Proliferationsrate als Zellen der Kontrollgruppe. Der Unterschied ist nicht signifikant (50  $\mu$ M Cisplatin: TM zur Kontrolle: 57.54 +/- 38.01 zu 48.68 +/- 30.03; 100  $\mu$ M Cisplatin: TM zur Kontrolle: 50.07 +/- 35.90 zu 42.55 +/- 12.96, beides statistisch nicht signifikant unterschiedlich, Abbildung Anhang 2).

Caki-2-Zellen mit TM-Vorbehandlung zeigen höhere Proliferationsraten als Zellen der Kontrollgruppe sowohl bei Behandlung mit niedrigen als auch mit höheren Konzentrationen von Cisplatin. Dieser Unterschied ist nicht signifikant (20  $\mu$ M Cisplatin: TM zur Kontrolle: 47.22 +/- 22.04 zu 31.08 +/- 9.3; 50  $\mu$ M Cisplatin: TM zur Kontrolle: 32.77 +/- 11.9 zu 15.59 +/-3.39; 100  $\mu$ M Cisplatin: TM zur Kontrolle: 31.47 +/- 11.41 zu 13.39 +/- 3.13, Ergebnisse statistisch nicht signifikant unterschiedlich, Abbildung Anhang 2).

## 3.8 Einfluss der CALR-Expressionsregulierung auf die Apoptoserate in RCC-Zellen unter Cisplatin-Behandlung

Die Abbildungen 17 und 18 zeigen die Apoptoserate von RCC-Zelllinien mit veränderter CALR-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (unveränderte CALR-Expression).

In Abbildung 17 ist die Apoptoserate von A498- und Caki-2-Zellen mit Knockdown-CALR gegenüber der Kontrollgruppe dargestellt. Die Apoptoserate von beiden Zelllinien steigt mit steigender Konzentration der Cisplatin-Behandlung.

A498-Zellen zeigen mit CALR-Knockdown bereits ohne Cisplatin-Behandlung eine höhere Apoptoserate als Kontrollzellen (0 µM CALR-Knockdown gegenüber Kontrolle, im Folgenden wird immer die Summe aus Annexin V- und Annexin V/PI-positiven Zellen betrachtet: Mittelwert und Standardabweichung 21.93 +/- 1.886 zu 7.773 +/- 4.353, kein signifikanter Unterschied, Abbildung 17). Die Apoptoserate verändert sich bei steigender Konzentration von Cisplatin wenig in Zellen mit Knockdown-CALR, wohingegen die Apoptoserate von Kontrollzellen deutlicher ansteigt (20  $\mu$ M CALR-Knockdown gegenüber Kontrolle: 21.53 +/- 1.443 zu 12.26 +/- 2.045, kein signifikanter Unterschied; 50  $\mu$ M CALR-Knockdown gegenüber Kontrolle: 25.55 +/- 4.708 zu 15.23 +/- 6.124, kein signifikanter Unterschied, Abbildung 17). Die Unterschiede zwischen CALR-Knockdown- und Kontrollzellen sind nicht signifikant. Bei Behandlung mit hohen Konzentrationen von Cisplatin nimmt die Apoptoserate in der Kontrollgruppe deutlich stärker zu, während sie in CALR-Knockdown-Zellen weniger stark ansteigt. Der Unterschied zwischen den beiden Zelltypen ist an dieser Stelle signifikant (100  $\mu$ M CALR-Knockdown gegenüber Kontrolle: 34.25 +/- 4.764 zu 56.73 +/- 25.67, p < 0.05, Abbildung 17).

In Caki-2-Zellen ist die Apoptoserate in der Kontrollgruppe im Bereich weniger Prozent und zeigt keinen Unterschied zwischen Zellen mit CALR-Knockdown und Kontrollzellen (0  $\mu$ M CALR-Knockdown gegenüber Kontrolle: 3.51 +/- 2.71 zu 4.725 +/- 2.836, kein signifikanter Unterschied, Abbildung 17). Bei steigender Konzentration nimmt die Apoptoserate sowohl von CALR-Knockdown- als auch Kontrollzellen zu. Dabei zeigt sich eine nicht signifikant höhere Apoptoserate der Kontrollgruppe zu CALR-Knockdown-Zellen (20  $\mu$ M CALR-Knockdown gegenüber Kontrolle: 15.57 +/- 10.27 zu 22.72 +/- 21.39; 50  $\mu$ M: 30.54 +/- 21.01 zu 36.62 +/- 27.51; 100  $\mu$ M: 42.64 +/- 16.06 zu 52.65 +/- 24.3, zwischen allen drei Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied, Abbildung 17).



#### Abbildung 17: Einfluss der CALR-Herunterregulierung (KD) auf die Apoptoserate von RCC-Zellen unter Cisplatin-Behandlung

I: exemplarische Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse, II: Auswertung der Versuche: Angabe in Prozent von Annexin V (V+)- und Annexin V/PI (V+/PI+)-positiven Zellen an der Gesamtzahl der gezählten Zellen von A498- (A) und Caki-2-Zelllinien (B) mit Knockdown-CALR (KD-CALR) gegen Zellen mit unveränderter CALR-Regulierung. Die Ergebnisse sind als **Mittelwert mit Standardabweichung** dargestellt. Im Gegensatz zum MTT-Test (z. B. Abbildung 15) und auch zur Darstellung der Western Blots (z. B. Abbildung 8) sind die Werte in dieser Grafik nicht gegen die unbehandelte Kontrollgruppe (0  $\mu$ M Cisplatin) normalisiert, da bereits für die Kontrollgruppe absolute Werte vorliegen. Die signifikanten Unterschiede der Summe aus Annexin V- und Annexin V/PI-positiven Ergebnissen sind mittels Balken angezeigt. Signifikanzniveaus sind wie folgt angegeben: \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001;

In Abbildung 18 ist die Apoptoserate von Caki-2-Zellen mit hochreguliertem CALR unter Behandlung mit Cisplatin gegen Caki-2-Zellen mit unveränderter CALR-Regulierung aufgetragen. Schon ohne Behandlung mit Cisplatin (0  $\mu$ M) zeigen Zellen mit hochreguliertem CALR eine nicht signifikant höhere Apoptoserate als Zellen der Kontrollgruppe (0  $\mu$ M CALR-Hochregulierung gegenüber Kontrolle: 27 +/- 23.55 zu 4.715 +/- 2.552, kein signifikanter Unterschied, Abbildung 18). Bei Behandlung mit niedrigen und mittleren Konzentrationen von Cisplatin ist der Unterschied weiterhin sichtbar, nimmt aber etwas ab (20 μM CALR-Hochregulierung gegenüber Kontrolle: 51.36 +/- 9.473 zu 28.42 +/- 25.73; 50 μM: 66.01 +/- 16.74 zu 46.33 +/- 37.57, beides nicht statistisch signifikant, Abbildung 18). Wenn mit hohen Konzentrationen von Cisplatin behandelt wird, ist der Unterschied in der Apoptoserate zwischen Zellen mit hochreguliertem CALR und Kontrollzellen deutlich geringer (100 μM CALR-Hochregulierung gegenüber Kontrolle: 67.69 +/- 20.65 zu 58.3 +/-34.92, kein statistischer Unterschied, Abbildung 18). Für A498-Zellen liegt an dieser Stelle kein Ergebnis vor. Dies ist wie bereits im Proliferationstest (Kapitel 3.7) darauf zurückzuführen, dass sich A498-Zellen mit dem verwendeten Plasmid teilweise unzureichend transfizieren ließen (siehe auch Kapitel 3.5). A498-Zellen sind Karzinomzellen eines bereits metastasierten Karzinoms, was hochgradige Veränderungen auf Ebene des Genoms und Proteoms vermuten lässt. Die fehlende Hochregulierung von CALR nach Transfektionsbehandlung könnte über einen vermehrten Efflux des Plasmids erklärt werden, über den sich A498-Zellen vor einer Behandlung schützen.



#### Abbildung 18: Apoptoserate von Caki-2-Zellen mit hochreguliertem CALR unter Cisplatin-Behandlung

I: exemplarische Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse, II: Auswertung der Versuche: Angabe in Prozent von Annexin V (V+)- und Annexin V/PI (V+/PI+)-positiven Zellen an der Gesamtzahl der gezählten Zellen von Caki-2-Zelllinien mit CALR-Hochregulierung gegen Zellen mit unveränderter CALR-Regulierung. Die Ergebnisse sind als **Mittelwert mit Standardabweichung** dargestellt. Im Gegensatz zum MTT-Test (z. B. Abbildung 15) und auch zur Darstellung der Western Blots (z. B. Abbildung 8) sind die Werte in dieser Grafik nicht gegen die unbehandelte Kontrollgruppe (0  $\mu$ M Cisplatin) normalisiert, da bereits für die Kontrollgruppe absolute Werte vorliegen. Die signifikanten Unterschiede der Summe aus Annexin V-und Annexin V/PI-positiven Ergebnissen sind mittels Balken angezeigt. Signifikanzniveaus sind wie folgt angegeben: \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,001

#### 3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

In Abbildung 19 werden zusammenfassend die Regulierungen der untersuchten ER-Stressproteine dargestellt.

Tabelle 11 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse der Proliferations- und Apoptoseassays. Sie sind als Unterschiede von A498- und Caki-2-Zellen mit veränderter CALR-Regulierung zur Kontrolle angegeben.





Jeder Graph stellt ein untersuchtes Protein einer Zellreihe dar. Die Werte sind analog der Western-Blot-Darstellung im Ergebnisteil (Kapitel 3.4) als zur Kontrolle normalisierte Regulierungen der Proteine angegeben. Zur besseren Übersicht sind Werte für A498- und Caki-2-Zellen etwas versetzt eingezeichnet.

#### Tabelle 11: Zusammenfassung von Proliferations- und Apoptoserate von RCC-Zelllinien unter Cisplatin-Behandlung

Dargestellt sind Unterschiede in der Proliferations- und Apoptoserate von RCC-Zelllinien zur Kontrolle. CALR-Knockdown (KD) oder Hochregulierung (CALR <sup>↑</sup>) sind in Spalte drei angegeben. Unterschiede von mehr als zehn Prozent sind mit einem Pfeil in die entsprechende Richtung angezeigt, in Klammern, wenn sie nicht signifikant sind. Es wird immer von der veränderten Zellpopulation zur Kontrolle angegeben, z. B. wird eine höhere Proliferationsrate von A498-Zellen mit KD-CALR zur Kontrollgruppe mit einem Pfeil nach oben gekennzeichnet.

Versuch	Zelllinie	CALR	0 μΜ	20 μΜ	50 µM	100 μM
Proliferation	A498	KD		$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$
Proliferation	Caki-2	KD		(†)	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$
Proliferation	A498	CALR ↑		$(\downarrow)$	(↓)	$\leftrightarrow$
Proliferation	Caki-2	CALR ↑		<b>↑</b> *	(†)	(†)
Apoptose	A498	KD	(†)	$\leftrightarrow$	(†)	$\downarrow$ *
Apoptose	Caki-2	KD	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$	(↓)
Apoptose	Caki-2	CALR ↑	(†)	(†)	(†)	$\leftrightarrow$

#### 4 Diskussion

#### 4.1 Chemoresistenz des Nierenzellkarzinoms

Die intrinsische Resistenz gegenüber Chemotherapie verhindert bei Nierenzellkarzinomen im fortgeschrittenen Stadium bis zum aktuellen Zeitpunkt die routinemäßige Anwendung von Chemotherapeutika. Ein bisher wenig auf Resistenzvermittlung untersuchter Wirkungsweg von Chemotherapeutika erfolgt über das Auslösen von ER-Stress und im Anschluss aktivierte Apoptosekaskaden (Mandic et al. 2003).

CALR ist ein zentrales Chaperon der Zelle, das zum einen an der Reaktion auf ER-Stress (Yoshida et al. 1998), zum anderen an der Progession von verschiedenen Karzinomen (siehe Kapitel 1.6) und weiterhin an der Entstehung von Nierenfibrose (Dihazi et al. 2013) und damit möglicherweise auch an der Progression von RCCs beteiligt ist. Diese Tatsache veranlasste uns, CALR in RCC-Zellen bei der Therapie mit Zytostatika genauer zu untersuchen. Beispielhaft für andere Chemotherapeutika wurde in dieser Arbeit Cisplatin verwendet. CALR wurde als mögliches therapeutisches Ziel für die verbesserte Wirkung von Chemotherapie bereits identifiziert (Martins et al. 2011) und weitere Erkenntnisse könnten zur Umgehung der Chemoresistenz von RCCs beitragen.

#### 4.2 Methodendiskussion

In dieser Arbeit wurde die Rolle von CALR und anderen ER-Stressproteinen in der Resistenzvermittlung von RCC-Zelllinien auf Cisplatin untersucht. Es wurde ein Versuchsaufbau verwendet, der in der Arbeitsgruppe bereits für die Untersuchung der Bedeutung verschiedener Proteine bei Behandlung mit Therapeutika in Karzinomzellen etabliert ist (Trivedi et al. 2016a; Trivedi et al. 2016b). In anderen Arbeitsgruppen werden *in-vitro*-Modelle nach ähnlichem Schema genutzt, um eine Beteiligung bestimmter ER-Stressproteine an der Chemoresistenz verschiedener Karzinomtypen nachzuweisen (Martin et al. 2015; Corazzari et al. 2007; Lee et al. 2008).

Bestandteil dieser Versuchsreihen sind zum einen Nachweise der Hochregulierung von ER-Stressproteinen, häufig mittels proteomischer Analysen, Western Blots oder dem Nachweis einer erhöhten mRNA-Regulierung. Zum anderen werden Proliferations- und Apoptoseassays bei Knockdown oder Überexpression des untersuchten Proteins zur Überprüfung von dessen Einfluss auf die Wirksamkeit eines Therapeutikums verwendet.

## 4.2.1 Regulierung von ER-Stressproteinen und Beteiligung der Chaperon-Funktion von CALR an der Chemoresistenz von RCC-Zelllinien

Für die Überprüfung von ER-Stressproteinen wurde in der vorliegenden Arbeit auf ausführliche proteomische Analysen verzichtet. Stattdessen wurden gezielt fünf Proteine, die an der Antwort der Zelle auf ER-Stress beteiligt sind, mittels Western Blot untersucht. Die Regulierung von GRP78 und GRP94, beides bekannte Effektorproteine des UPR-Signalweges (Lee 2001), wurde überprüft. Diese Vorgehensweise, insbesondere bei GRP78, dem zentralen Protein des UPR-Signalweges (siehe Kapitel 1.4), ist weit verbreitet, um ER-Stress in Zellen zu überprüfen (Mandic et al. 2003; Rutkowski et al. 2006; Wang et al. 2009). ATF6A als eines der drei UPR-Signalproteine wurde zusätzlich untersucht. An dieser Stelle sei anzumerken, dass nicht ebenfalls die beiden anderen UPR-Signalproteine IRE 1 und PERK (siehe Kapitel 1.4) in den Versuch einbezogen wurden, um eine umfassende Darstellung des UPR-Signalweges sicherzustellen. Weiterhin wird in vielen Arbeiten eine zusätzliche Methode verwendet, um gesicherte Ergebnisse noch einmal zu bestätigen (z. B. auf der Transkriptions-Ebene) (Rutkowski et al. 2006; Peyrou et al. 2007). In anderen Arbeiten wird auf diese Bestätigung verzichtet (Wang et al. 2009; Martin et al. 2013) und eine Teildarstellung des UPR-Signalweges gilt vielen Autoren als ausreichend, um ER-Stress in Zellen nachzuweisen (Martins et al. 2011; Feng et al. 2011; Al-Rawashdeh et al. 2010).

CALR wurde im gleichen Versuch überprüft, um eine Aussage über seine Beteiligung an der Resistenzvermittlung zu erhalten. ERP57 wurde zudem als wichtiges Co-Chaperon von CALR in den Versuch mit einbezogen, um mit den oben besprochenen Proteinen den Einfluss der Chaperon-Funktion von CALR zu untersuchen. Tunicamycin (TM) als bekannter und häufig verwendeter ER-Stress-Auslöser wurde in dieser Arbeit verwendet, um den kombinierten Einfluss von hochregulierten ER-Stressproteinen auf RCC-Zellen unter Therapie mit Cisplatin zu überprüfen. Die Auswertung der Western Blots erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm Image J nach einer modifizierten Methode von Miller (2010). Diese Methode ist in der Arbeitsgruppe etabliert.

Für genauere Informationen über die Lokalisation von CALR in der Zelle und damit Aussagen über die durchgeführte Funktion wurden Immunfluoreszenzfärbungen von CALR in RCC-Zelllinien unter Behandlung mit Cisplatin angefertigt. Diese Methode wird in verschiedenen *in-vitro*-Modellen verwendet, in aktuelleren Arbeiten meist zum Nachweis von CALRvermitteltem ICD (Martins et al. 2011; Obeid et al. 2007; Panaretakis et al. 2008). In den genannten Publikationen wurde CALR sowohl in nicht-permeabilisierten als auch in permeabilisierten Zellen gefärbt, um die Lokalisation an der Zelloberfläche und innerhalb der Zelle zu untersuchen. Die Translokation von CALR an die Zelloberfläche unter Cisplatin-Therapie war nicht Teil der Fragestellung dieser Arbeit. Deshalb wurden in dieser Arbeit Färbungen mit permeabilisierten Zellen vorgenommen, um (wie oben beschrieben) einen Überblick über die vorwiegende Lokalisation von CALR innerhalb der Zelle bei Behandlung mit Cisplatin zu erhalten.

#### 4.2.2 Proliferation und Apoptose zum Nachweis des Einflusses von CALR auf die Therapie mit Cisplatin

Proliferations- und Apoptoserate unter Hoch- und Herunterregulierung eines Proteins werden in vielen *in-vitro*-Modellen zur Messung des Einflusses eines Proteins auf die Wirksamkeit eines Therapeutikums verwendet. Zur Apoptosemessung wird meist eine Färbung mit Propidiumiodid (Feng et al. 2011; Martin et al. 2015), teilweise in Kombination mit Annexin V (Higa et al. 2014; Feng et al. 2015), und anschließender durchflusszytometrischer Untersuchung durchgeführt. Alternativ steht die Messung aktivierter Caspasen zur Verfügung, die als weniger sensitiv beschrieben wird (Corazzari et al. 2007). Die Proliferationsrate wurde mit dem MTT-Test gemessen, der hierfür vielfach verwendet wird (Lee et al. 2008; Al-Rawashdeh et al. 2010; Xu et al. 2012). Die Regulierung von CALR wurde vor den oben genannten Versuchen mit siRNA- und Plasmidtransfektionen verändert. Um einen Effekt der Transfektion auf die Proliferations- und Apoptoserate von Zellen auszuschließen, wurden Kontrollen der siRNA-Transfektion mit einer unspezifischen siRNA vorgenommen. Plasmid-Transfektionen wurden mit einer regulären Zellkontrolle vorgenommen. Die Transfektion von A498-Zellen mit Plasmid zeigte eine nicht signifikante Hochregulierung von CALR (zur genaueren Erläuterung siche hierzu auch Kapitel 3.5).

#### 4.3 Behandlung der Zellen mit Cisplatin

Das Ergebnis der Behandlung von A498- und Caki-2-Zellen mit Cisplatin wurde überprüft. Es wurden für die nachfolgenden Versuche Behandlungskonzentrationen von Cisplatin und eine Behandlungsdauer gesucht, bei der signifikante Unterschiede in der Proliferations- und Apoptoserate nachgewiesen werden konnten. Frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe wurden mit in die Überlegung einbezogen (Trivedi et al. 2016a). Regelmäßige lichtmikroskopische Kontrollen bestätigten eine sichtbare konzentrationsabhängige Abnahme der Proliferationsrate und eine Zunahme der Apoptoserate. Wir gingen nach diesen Ergebnissen davon aus, dass sich Proliferations- und Apoptoserate in einem Bereich befanden, in dem weder ein zu hoher Anteil der Zellen durch das Therapeutikum apoptotisch wurde, noch alle Zellen überlebten und kein Effekt sichtbar war. Dies ermöglichte einen ausreichenden Nachweis von Unterschieden (in Apoptose und Proliferation) zwischen den Behandlungsgruppen.

#### 4.4 Lokalisation von CALR in RCC-Zelllinien

Calretikulin kann innerhalb der Zelle in unterschiedlichen Kompartimenten nachgewiesen werden und führt dort je nach Lokalisation unterschiedliche Funktionen aus: Im Zellkern regelt es die Expression bestimmter Gene, im ER nimmt es seine Funktion als essenzielles kalziumbindendes Chaperon wahr. Im Zytosol ist es über die Bindung an Integrine an Zelladhäsion und -mobilität beteiligt und an der Zelloberfläche ist es in neoplastischen Zellen zu finden oder vermittelt immunologische Funktionen (Michalak et al. 1999, siehe auch Kapitel 1.6). Um seine Funktion in der Chemoresistenz von RCCs genauer einzugrenzen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen von CALR unter Therapie mit Cisplatin vorgenommen. Dabei wurde CALR vorwiegend perinukleär detektiert, also im ER lokalisiert. Bei einer Behandlung mit höheren Konzentrationen Cisplatin nahm die Signalstärke von CALR ab. Die abnehmende Intensität bei Behandlung mit höheren Konzentrationen von Cisplatin steht im Kontrast zu den Resultaten des Western Blot (Abschnitt 3.3), bei denen in Caki-2-Zellen eine nicht signifikante Hochregulierung von CALR bei Therapie mit hohen Konzentrationen Cisplatin (100 µM) zu beobachten war.

#### 4.5 Regulierung von ER-Stressproteinen unter Cisplatin-Therapie

In diesem Teil der Arbeit wurde überprüft, ob Cisplatin ER-Stress in RCC-Zelllinien auslöst. Damit sollte eine Beteiligung von CALR an der Chemoresistenz des RCC über seine Funktion als essenzielles Chaperon des ER untersucht werden. Es wurden fünf Proteine überprüft, die als Chaperone (GRP78, GRP94 und CALR), Co-Chaperon (ERP57) oder Signalproteine (GRP78 und ATF6A) am UPR-Signalweg beteiligt sind (siehe Kapitel 1.4).

#### 4.5.1 GRP78 und GRP94

Die Rolle von GRP78 und GRP94 in Zellsignalwegen und als essenzielle Chaperone des ER (siehe Kapitel 1.4) sowie ihre Verwendung in der experimentellen Forschung in Bezug auf ER-Stress wurden an anderer Stelle bereits besprochen (siehe Kapitel 4.2.1). Viele Neoplasien zeigen ein rasches und wenig kontrolliertes Wachstum, bei dem eine hohe Menge an Proteinen anfällt, die gefaltet werden müssen. Insbesondere GRP78 ist deswegen in vielen Tumoren einschließlich Nierenzellkarzinomen im Vergleich zum normalen Gewebe erhöht (Fu et al. 2010; Daneshmand et al. 2007; Shuda et al. 2003). Unter der Therapie mit Cisplatin zeigte sich in unserem Versuch eine konzentrationsabhängige (bei Therapie mit 100  $\mu$ M Cisplatin) Hochregulierung in Caki-2-Zellen. A498-Zellen zeigten eine nicht signifikante Hochregulierung bei der Therapie mit niedrigen Konzentrationen Cisplatin (20  $\mu$ M). In mehreren Publikationen wird bei der Therapie mit Zytostatika meist eine Hochregulierung von GRP78 beobachtet (Wang et al. 2009; Corazzari et al. 2007). Zudem wirkt sich die vorherige Induktion von GRP78 bei anschließender Zytostatika-Therapie protektiv aus (Virrey et al. 2008; Martin et al. 2015). Ein Knockdown oder die Blockade von GRP78 sensibilisiert hingegen Zellen in der großen Mehrzahl der Veröffentlichungen für eine zytostatische Therapie (Wang et al. 2009; Virrey et al. 2008).

GRP94 zeigt in Caki-2-Zellen eine nicht signifikante Hochregulierung bei Behandlung mit hohen Konzentrationen von Cisplatin (100  $\mu$ M), wohingegen es in A498-Zellen bei niedrigen und mittleren Konzentrationen (20  $\mu$ M und 50  $\mu$ M) signifikant hochreguliert ist und bei hohen Konzentrationen (100  $\mu$ M) auf das Ausgangsniveau abfällt.

Bei der Therapie mit Cisplatin sind bezüglich der beiden Proteine abhängig von verwendeter Behandlungskonzentration und Zelllinie unterschiedliche Ergebnisse zu finden. Einige Publikationen sprechen für die Hochregulierung (Mandic et al. 2003; Lee et al. 2008; Rovetta et al. 2012), andere dagegen (Peyrou et al. 2007; Trivedi et al. 2016a). Eine protektive Auswirkung für die Therapie mit Cisplatin durch die Induktion von ER-Stressproteinen (insbesondere GRP78) wird beobachtet (Feng et al. 2011; Peyrou und Cribb 2007; Lee et al. 2008), teilweise zeigt sich aber auch ein gegenteiliger Effekt (Xu et al. 2012).

#### 4.5.2 ERP57

ERP57, eine Proteindisulfidisomerase, ist das wichtigste Co-Chaperon von CALR und wird bei ER-Stress hochreguliert (siehe Kapitel 1.4). In A498-Zellen war ERP57 nicht signifikant zur Kontrolle verändert, in Caki-2-Zellen zeigte sich unter Therapie mit hohen Konzentrationen von Cisplatin (100 µM) eine signifikante Hochregulierung. Bei der Therapie mit Zytostatika werden unterschiedliche Reaktionen von ERP57 in der Literatur angegeben. Corazzari et al. (2007) beschreiben eine Hochregulierung, Trivedi et al. (2016b) eine Herunterregulierung. Konsens ist, dass die Induktion von ERP57 die Apoptoserate von Tumorzellen bei Therapie mit Zytostatika verringert (Trivedi et al. 2016b) und der Knockdown von ERP57 diese Apoptoserate erhöht (Corazzari et al. 2007). Zudem wird derzeit an der therapeutischen Inhibition von Proteindisulfidisomerasen (u. a. ERP57) mit erfolgsversprechenden Resultaten geforscht (Vatolin et al. 2016).

#### 4.5.3 ATF6A

ATF6A ist eines von drei Signalproteinen des UPR-Signalweges und wird bei dessen Aktivierung von einer 90p-Einheit zu einer aktiven 50p-Untereinheit gespalten, die wiederum zur vermehrten Transkription der UPR-Effektorproteine GRP94, GRP78 und CALR führt (siehe Kapitel 1.4). ATF6A p90 wurde in Caki-2-Zellen signifikant zur Kontrolle herunterreguliert. Bei A498-Zellen liegt ein singuläres Ergebnis vor, sodass keine eindeutige Aussage über die Regulierung getroffen wird (genauere Darstellung in Kapitel 3.3). Die Herunterregulierung in Caki-2-Zellen könnte für eine vermehrte Spaltung sprechen und wird damit auch in der Literatur in Zusammenhang gebracht (Higa et al. 2014). Länger anhaltender ER-Stress wird hingegen mit einer Hochregulierung (und erleichterter ER-Stress mit einer Herunterregulierung) von ATF6A beschrieben (Li et al. 2000; Trivedi et al. 2016b). Bestätigt werden die Ergebnisse der p90-Einheit durch die der p50-Untereinheit nicht. Hier zeigt sich eine nicht signifikante Herunterregulierung, was gegen eine vermehrte Aktivierung des UPR-Signalweges spricht.

Anzumerken ist, dass dauerhafte Expositionen gegenüber Auslösern von ER-Stress bevorzugt eine konstante Hochregulierung der Effektorproteine (z. B. GRP78) zur Folge haben (und weniger von ATF6A selbst, Rutkowski et al. 2006) und Shang und Lehrman (2004) wiesen nach, dass das mRNA-Level der Effektorproteine nicht zwangsläufig mit dem der Transkriptionsfaktoren (wie beispielsweise ATF6A) übereinstimmt. Insofern liegt der Fokus zum Nachweis der UPR-Aktivierung auf GRP78 und GRP94.

#### 4.5.4 CALR

Die Funktionen von CALR wurden bereits an anderer Stelle ausführlich besprochen (siehe Kapitel 1.5 und 1.6). Die Analyse der Regulierung von CALR unter Therapie mit Cisplatin ergab in A498-Zellen keine Veränderung. In Caki-2-Zellen zeigte sich eine nicht signifikant erhöhte Regulierung unter der Therapie mit hohen Konzentrationen Cisplatin (100  $\mu$ M). CALR wird bei ER-Stress in der Zelle mit GRP78 und GRP94 hochreguliert und die Induktion von ER-Stress hat sich in der Therapie mit Cisplatin als protektiver Faktor erwiesen (Lin et al. 2011). Jedoch ist die Regulierung von CALR unter Cisplatin-Therapie abhängig von Behandlungskonzentration und verwendeter Zelllinie. So wurden sowohl Hoch-, als auch unveränderte Regulierung nachgewiesen (Coling et al. 2007; Trivedi et al. 2016a).

#### 4.5.5 Reaktion von RCC-Zellen auf die Therapie mit Tunicamycin (TM)

Tunicamycin (TM) wurde verwendet, um den Einfluss mehrerer ER-Stressproteine auf die Therapie von RCC-Zellen mit Cisplatin zu überprüfen. In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe an humanen Nierenzellen zeigte sich eine signifikante Hochregulierung von ER-Stressproteinen unter Behandlung mit TM (Dihazi et al. 2013). Auch andere Arbeiten verwenden TM als sicheren Auslöser von ER-Stress (Okada et al. 2002; Xu et al. 2012). Dieser Versuch zeigte zwar eine Hochregulierung von ER-Stressproteinen wie GRP78, allerdings waren die Ergebnisse nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle für die verwendete Konzentration. In den angegebenen Ergebnissen zeigt sich ein nicht signifikanter Proliferationsvorteil von Zellen mit vorherig induziertem ER-Stress. Dies ist konsistent mit Ergebnissen der Literatur: Peyrou et al. (2007) zeigten z. B., dass Präkonditionierung mit TM zu einer verminderten Toxizität von Cisplatin führt.

#### 4.6 Fazit: ER-Stress in RCCs bei der Therapie mit Cisplatin

Die dargestellten Ergebnisse, insbesondere von GRP78, GRP94, ERP57 und auch ATF6A p90 in Caki-2-Zellen deuten auf eine Aktivierung des UPR-Signalweges hin. CALR zeigte in Caki-2-Zellen keine signifikant veränderte Regulierung, allerdings eine nicht signifikante Hochregulierung bei Behandlung mit hohen Konzentrationen von Cisplatin (100 µM), was mit den Ergebnissen der genannten anderen Proteine (GRP78, GRP94 und ERP57) zusammenpasst. Zusammengefasst sprechen die Ergebnisse für eine Verursachung von ER-Stress durch die Behandlung mit Cisplatin und es lässt sich ein dosisabhängiger Effekt beobachten. Dieses Ergebnis ist überwiegend mit der Literatur konsistent. Eine signifikante Aussage lässt sich aus den Ergebnissen nicht abschließend treffen. An dieser Stelle könnte eine zweite Methode zur Bestätigung der Western Blots, beispielsweise die Untersuchung von CALR und GRP78 auf mRNA-Ebene, in zukünftigen Arbeiten angestrebt werden.

CALR selbst wird bei hohen Konzentrationen von Cisplatin in Caki-2-Zellen nicht signifikant hochreguliert, also interessanterweise dann, wenn ein hoher Anteil der Zellen apoptotisch oder nekrotisch ist. Insofern könnte die vermehrte Expression für einen protektiven Effekt des Proteins sprechen, könnte aber auch Teil des induzierten Apoptosewegs sein. In den folgenden Kapiteln wird diese Frage genauer erörtert.

### 4.7 Einfluss von CALR auf die Proliferationsrate von Zellen unter Cisplatin-Therapie

Zur Überprüfung eines Einflusses von CALR auf die Chemoresistenz von RCCs wurde die Proliferationsrate von RCC-Zelllinien mit Knockdown-CALR und CALR-Hochregulierung unter der Therapie mit Cisplatin ermittelt. Für A498-Zellen besteht kein Unterschied zwischen der Proliferationsrate von CALR-Knockdown-Zellen gegenüber der Kontrolle. In A498-Zellen mit hochreguliertem CALR zeigte sich ein nicht signifikanter Proliferationsnachteil gegenüber der Kontrolle, insbesondere bei Behandlung mit niedrigen Cisplatin-Konzentrationen (20 µM). Für Caki-2-Zellen wurde ein nicht signifikanter Proliferationsvorteil von Zellen mit herunterreguliertem CALR verglichen mit der Kontrolle erhoben. Bei Behandlung mit höheren Konzentrationen Cisplatin zeigte sich ein signifikanter Proliferationsvorteil von Zellen mit hochreguliertem CALR gegenüber der Kontrolle. Dieser Proliferationsvorteil war bei Behandlung mit höheren Konzentrationen Cisplatin noch zu beobachten, allerdings nicht mehr signifikant.

CALR kann in Bezug auf die Proliferationsrate von Tumoren unterschiedliche Effekte haben. Einerseits werden hochregulierte CALR -Werte in *in-vitro*-Modellen mit vermehrter Migration und Proliferationsrate von Tumorzellen verschiedenen Ursprungs in Verbindung gebracht. An anderer Stelle wird kontrovers diskutiert, ob eine CALR-Hochregulierung in Zellen zur Zellzyklusprogression (Feng et al. 2015; Huang et al. 2016) oder zum Zellzyklusarrest führt (Liu et al. 2015). Dies scheint abhängig von der untersuchten Zellreihe zu sein (Sheng et al. 2014). Zudem ist CALR an der Migration und Proliferation verschiedener Tumoren beteiligt. CALR-Knockdown führt dabei zu verminderter Migration und weniger Proliferation (Lu et al. 2011; Chiang et al. 2013). Abschließend sei die Arbeit von Sheng et al. (2014) genannt, in der nachgewiesen wurde, dass der Knockdown von CALR eine Verminderung der Chemoresistenz von pankreatischen Tumorzellen zur Folge hat. Dies wurde anhand einer verminderten Proliferationsrate unter Therapie mit Gemeitabin und Oxaliplatin nachgewiesen.

Andererseits gilt CALR als das zentrale Signalprotein für immunologischen Zelltod (ICD, *immunogenic cell death*), wenn es an die Zelloberfläche verlagert wird (siehe Kapitel 1.6). In dieser Hinsicht hat der Knockdown von CALR und anderen Proteinen der ER-Stress-Kaskade, die als Signal für die Translokation von CALR dienen, einen protektiven Einfluss auf die Proliferation unter Behandlung mit Zytostatika, da auf diese Weise weniger ICD in der Zelle ausgelöst werden kann. So wiesen Xu et al. (2017) in chemoresistenten Endometrium-karzinom-Zellen verminderte Konzentrationen von CALR und ebenjenen Proteinen nach. Diese stiegen auch nach Zytostatika-Therapie nicht an, im Gegensatz zu nicht-resistenten Kontrollzellen. CALR-Hochregulierung und Auslösen von ER-Stress in resistenten Zellen hingegen förderten ICD und verminderten die Proliferationsrate der Zellen.

Der Einfluss von CALR auf die Proliferationsrate ist nach den oben dargestellten Ergebnissen deutlich abhängig vom Zelltyp. Auch in der angegebenen Literatur werden unterschiedliche Ergebnisse beobachtet. Eine Vielzahl verschiedener Mechanismen sind in die Zellproliferation involviert und darüber könnten die Unterschiede erklärt werden. Häufig wird ein solcher Proliferationsvorteil von Zellen mit hochreguliertem CALR beobachtet. Dies ist für Caki-2 konsistent mit den Ergebnissen der Western-Blot-Analyse, in denen eine steigende, nicht signifikante Hochregulierung von CALR bei Behandlung mit steigenden Konzentrationen von Cisplatin erhoben wurde. Auch zeigt sich in Zellen, in denen über TM ER-Stressproteine hochreguliert wurden, für Caki-2-Zellen ein nicht signifikanter Proliferationsvorteil. Überraschend ist, dass in Caki-2-Zellen mit Knockdown-CALR ebenfalls ein Proliferationsvorteil gegenüber der Kontrolle erhoben wurde. A498-Zellen verhalten sich entgegengesetzt, mit einer statistisch nicht signifikant niedrigeren Proliferationsrate von Zellen mit hochreguliertem CALR und einer weitgehend gleichbleibenden Proliferationsrate von Zellen mit CALR-Knockdown zur Kontrolle. Weitere Erkenntnisse hierzu erbrachte der Apoptoseassay, der im folgenden Abschnitt behandelt wird.

## 4.8 Einfluss von CALR auf die Apoptoserate von RCCs unter der Therapie mit Cisplatin

Die Apoptoserate von RCC-Zelllinien mit veränderter CALR-Regulierung unter Therapie mit Cisplatin wurde mittels eines Annexin V/PI-Apoptoseassays gemessen. Der Versuch ergab für A498-Zellen mit Knockdown-CALR zunächst eine nicht signifikant höhere Apoptoserate gegenüber der Kontrolle bei Behandlung mit 0 µM, 20 µM und 50 µM Cisplatin, wobei die Apoptoserate von Knockdown-CALR-Zellen mit steigender Konzentration von Cisplatin wenig anstieg. Bei Behandlung mit 100 µM Cisplatin zeigte sich eine signifikant erhöhte Apoptoserate von Zellen der Kontrollgruppe zu Knockdown-CALR-Zellen. Der Versuch von A498-Zellen mit hochreguliertem CALR ergab bei eingeschränktem Erfolg der Transfektion kein verwertbares Ergebnis (siehe hierzu auch Kapitel 4.8). Caki-2-Zellen zeigten eine statistisch nicht signifikant verminderte Apoptoserate von Knockdown-CALR-Zellen gegenüber der Kontrolle und eine statistisch nicht signifikant höhere Apoptoserate von Zellen mit hochreguliertem CALR gegenüber der Kontrolle. Die höhere Apoptoserate trat bereits ohne Cisplatin-Behandlung (0 µM) auf. Der Einfluss von CALR auf die Apoptoserate von Zellen wurde in zahlreichen Arbeiten untersucht, häufig auch in Kombination mit deren Proliferationsrate. Zunächst wird CALR als ER-Stressprotein bei der Therapie mit Chemotherapeutika hochreguliert (Corazzari et al. 2007) und seine Herunterregulierung kann Teil des therapeutischen Wirkungsmechanismus sein (Trivedi et al. 2016b; Nakajo et al. 1996). Darüber hinaus wurde eine generelle Beteiligung von CALR an Chemoresistenz beispielsweise von Lungenkarzinomen von Chou et al. (2015) festgestellt. Der Knockdown von CALR wird häufig mit einer erhöhten Apoptoserate in Zusammenhang gebracht: Feng et al. (2015) beschrieben dies in Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms über die Regulierung des Zellzyklus. Liu et al. (2013) wiesen eine Beteiligung von Integrinen an der Verminderung von Apoptose über eine vermehrte Adhäsion unter Chemotherapie nach und benennen Calretikulin als das zytosolische Bindungsprotein. Umgekehrt vermittelt wiederum der Knockdown von CALR höhere Apoptoseraten über eine gestörte Adhäsionsfähigkeit der Zellen (Du et al. 2009). CALR scheint in Bezug auf seine ER-Chaperon-Funktion hingegen vor allem in den proapoptotischen Teil des UPR-Signalweges über das Auslösen von immunologischem Zelltod (ICD) und weniger in das Verhindern von Apoptose involviert zu sein (Obeid et al. 2007) (weitere Informationen siehe Kapitel 1.6 und 4.7). Dieser Mechanismus ist beteiligt an der Ausbildung von Chemoresistenz. Gleichzeitig wird Cisplatin als ein wenig potenter Auslöser von ER-Stress-getriggertem ICD beschrieben (Tesniere et al. 2010; Martins et al. 2011) und ICD tritt in vitro erst in Co-Kultur mit Immunzellen auf (Michaud et al. 2014), sodass eine Beteiligung dieses Signalweges von CALR in dieser Arbeit weitgehend ausgeschlossen werden kann.

Die Ergebnisse des Apoptoseassays weisen bei A498-Zellen und Caki-2-Zellen in die gleiche Richtung. Ein Knockdown von CALR zeigt für beide Zelllinien einen protektiven Effekt, wenn auch nicht signifikant, insbesondere für A498-Zellen, bei denen die Apoptoserate weitgehend unabhängig von der Cisplatin-Konzentration ist und eine Resistenz gegen Cisplatin auch bei Therapie mit hohen Konzentrationen aufzeigt. Die Hochregulierung stellt in Caki-2-Zellen hingegen einen nicht signifikanten Therapievorteil für Cisplatin bei erhöhten Apoptoseraten von Zellen mit CALR-Hochregulierung dar.

Dies steht im Gegensatz zu der Mehrzahl der Publikationen. Dort ist CALR an Prozessen der Adhäsion oder des Zellzyklus beteiligt, die Apoptose entgegenwirken, womit ein Knockdown zu vermehrter Apoptose führt. Der Vorgang, dass ein CALR-Knockdown über die fehlende Vermittlung von ICD verminderte Apoptoseraten auslöst, ist, wie oben beschrieben, unwahrscheinlich. Die Eigenschaften des verwendeten Zelltyps werden auch an dieser Stelle maßgeblich für die o. g. Ergebnisse sein und könnten die Unterschiede zur dargestellten Literatur erklären. Nicht ausgeschlossen ist, dass Nierenzellkarzinome auf Chemotherapie anders als die o.g. Karzinomtypen reagieren (hepatozelluläre Karzinome, Lungenkarzinome) und eine Herunterregulierung von CALR Teil der Resistenzentwicklung gegen Chemotherapie ist.

## 4.9 Fazit und Ausblick: Die Rolle von Calretikulin in der Chemoresistenz des Nierenzellkarzinoms

In den erhobenen Ergebnissen zeigt sich insgesamt, anders als zunächst in Kapitel 4.7 vermutet, der Trend, dass eine Herunterregulierung von CALR vermehrte Resistenz auslöst. Ein Knockdown von CALR hat in beiden Zelllinien einen nicht signifikanten protektiven Effekt, nachgewiesen durch eine verminderte Apoptoserate insbesondere in A-498-Zellen. Die Hochregulierung hingegen stellt einen Therapievorteil von Cisplatin in Caki-2-Zellen dar. Unterstützt wird dieser Trend durch die Ergebnisse der Proliferationstests v. a. für A498-Zellen, in denen ein Proliferationsnachteil von Zellen mit hochreguliertem CALR beobachtet wird. Caki-2-Zellen zeigen passend einen Proliferationsvorteil mit Knockdown-CALR. Interessanterweise zeigt sich auch ein Proliferationsvorteil für Zellen mit hochreguliertem CALR. Eine erhöhte Apoptoserate (wie im vergleichbaren Apoptoseassay sichtbar) schließt jedoch eine erhöhte Proliferationsrate z. B. als Kompensationsmechanismus nicht aus.

Dem oben beschriebenen Trend entgegen stehen die Proliferationsversuche mit TM mit einem Proliferationsvorteil von Zellen mit hochregulierten ER-Stressproteien sowie die fehlende Herunterregulierung von CALR unter Cisplatin-Therapie in den Western-Blots. Erstere zeigen allerdings den kombinierten Effekt der untersuchten Proteine und sollten bei weniger deutlicher Regulierung von CALR für die Fragestellung als nachrangig angesehen werden. Die fehlende Herunterregulierung könnte auch für einen proapoptotischen Effekt von CALR unter Therapie mit Cisplatin stehen und somit ein Knockdown weniger Apoptose und vermehrt Proliferation verursachen.

In der Literatur wird überwiegend ein entgegengesetzter Trend beobachtet. Die Herunterregulierung von CALR steht in der Mehrzahl der Publikationen im Zusammenhang mit verminderter Proliferation und vermehrter Apoptose. Dies ist abhängig vom untersuchten Zelltyp.

Nierenzellkarzinome besitzen eine hohe intrinsische Resistenz gegen Chemotherapie. Insofern könnten die dargestellten Ergebnisse Anhalt für eine Sonderposition des Nierenzellkarzinoms bezüglich der Rolle von CALR in der Vermittlung von Chemoresistenz sein und sollten weiterverfolgt werden. Insbesondere wird in aktuelleren Publikationen auf die Rolle von CALR in der Vermittlung von ICD eingegangen. Diese steht nach neueren Erkenntnissen in Zusammenhang mit Chemoresistenz (Xu et al. 2017) und ist in Nierenzellkarzinomen noch nicht erforscht.

Wenig Hinweis besteht hingegen dafür, dass CALR Chemoresistenz über seine Funktion als zentrales ER-Chaperon vermittelt. Zunächst besteht keine signifikante Hochregulierung in den Western-Blot-Analysen. CALR ist weiterhin in der Immunfluoreszenz bei Therapie mit höheren Konzentrationen von Cisplatin weniger deutlich perinukleär nachweisbar. Abschließend würde man bei Resistenzvermittlung als ER-Chaperon einen protektiven Effekt unter CALR-Hochregulierung erwarten, was nicht den Ergebnissen entspricht. Dennoch hatte die Präkonditionierung mit TM einen positiven Effekt auf die Proliferationsrate sowohl von A498- als auch von Caki-2-Zellen. Dies lässt den Schluss zu, dass andere Proteine des UPR-Signalwegs einen größeren Einfluss über ihre Funktion als ER-Chaperone haben. An dieser Stelle sei GRP78 genannt, welches bereits in zahlreichen Publikationen als wichtiges Protein in der Tumorgenese und -progression beschrieben wurde (siehe Kapitel 4.5.1). GRP78 wird unter Therapie mit Cisplatin signifikant in Caki-2-Zellen hochreguliert und zeigte sich ebenfalls unter TM signifikant induziert. Die weitere Untersuchung von GRP78 in Bezug auf Nierenzellkarzinome könnte den dargestellten Ergebnissen zufolge ebenfalls vielversprechend sein.

Die Vermittlung von Chemoresistenz in Nierenzellkarzinomen erfolgt durch eine Vielzahl verschiedener Mechanismen. Weitere Erkenntnisse sind nötig für die Entwicklung von effizienten Therapeutika. CALR zeigte sich in den Ergebnissen als Protein, was in der Resistenzvermittlung weiter untersucht werden sollte. So könnte es Zielstruktur von neueren Therapeutika werden, um Patienten mit metastasierter Erkrankung oder Rezidiv Therapieoptionen zu ermöglichen und ihre Prognose deutlich zu verbessern.

#### 5 Zusammenfassung

Das metastasierte Nierenzellkarzinom (mRCC) ist bis zum heutigen Zeitpunkt eine nicht heilbare Erkrankung (Rodriguez-Vida et al. 2017). Eine Chemotherapie ist wegen intrinsischer Resistenz der Zellen keine therapeutische Option (Lilleby und Fosså 2005). Calretikulin (CALR) als ein kalziumbindendes Chaperon des endoplasmatischen Retikulums (ER), spielt in der Entstehung und Progression von verschiedenen Tumoren eine wichtige Rolle (Chen et al. 2009). Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von CALR in seiner Funktion als essenzielles Chaperon in der Chemoresistenz des RCC zu untersuchen.

Dafür wurde ein *in-vitro*-Versuchsansatz an zwei Zellreihen des RCC angewendet. Dieser bestand aus Western-Blot-Analysen von CALR und weiteren ER-Stressproteinen sowie Immunfluoreszenz-Färbungen von CALR unter Therapie mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin. Dabei wurde CALR in RCC-Zelllinien durch eine Transfektionsbehandlung hochund herunterreguliert. Anschließend wurden MTT-Assays zur Messung der Proliferationsrate sowie durchflusszytometrische Analysen nach Annexin V/PI-Färbung zur Messung der Apoptoserate unter Cisplatin-Therapie durchgeführt.

Die Regulierungen von CALR und anderen ER-Stressproteinen waren sowohl abhängig von der Cisplatin-Konzentration als auch von der untersuchten Zelllinie. In Caki-2-Zellen zeigte sich dabei eine konzentrationsabhängige Hochregulierung von CALR und GRP78 (*glucose-regulated-protein*; GRP78: 1.687 +/- 0.5583, p = 0.0173). CALR wurde in der Immunfluoreszenz hauptsächlich perinukleär detektiert. Proliferationsassays zeigten sowohl einen Proliferationsvorteil für Zellen mit herunterreguliertem CALR als auch mit hochreguliertem CALR in Caki-2-Zellen (78.06 +/- 14.56 zu 40.96 +/- 23.33, p<0.05) sowie einen Proliferationsnachteil von A-498-Zellen mit hochreguliertem CALR. In Apoptoseassays wurden Überlebensvorteile von Zellen mit CALR-Herunterregulierung (A498: 34.25 +/- 4.764 zu 56.73 +/- 25.67, p < 0.05) im Gegensatz zu einem Therapievorteil in Caki-2-Zellen mit hochregulierten.

Dass eine Herunterregulierung von CALR vermehrte Proliferation und verminderte Apoptose begünstigt, deutet auf eine Beteiligung von CALR in der Progression und Chemoresistenz von RCCs hin. Eine Vermittlung der Chemoresistenz von CALR über seine Funktion als essenzielles ER-Chaperon konnte in dieser Arbeit dagegen nicht abschließend bestätigt werden. Weiterführende Untersuchungen, wie etwa einer Beteiligung in anderen apoptotischen Signalwegen [z. B. *immunogenic cell death* (ICD)] in RCCs sind erforderlich, um diese Resistenzentwicklung besser zu verstehen.

## 6 Anhang

### 6.1 Abbildungen

### 6.1.1 Western-Blot-Analysen mit Tunicamycin (TM)




64



## Abbildung Anhang 1: Western-Blot-Analysen von A498 und Caki-2 mit CALR und anderen ER-Stressproteinen unter TM-Behandlung

Dargestellt sind repräsentative Western Blots (linke Hälfte) von ER-Stressproteinen (CALR, GRP78, GRP94, ERP57 und ATF6A p50) und der Positivkontrolle ACTB mit den entsprechenden Auswertungen (rechte Hälfte) in RCC-Zellen (A: A498, B: Caki-2), die mit aufsteigenden TM-Konzentrationen behandelt wurden. Angabe der zur Kontrolle normalisierten Werte als **Mittelwert mit Standardabweichung**. Signifikante Unterschiede von jeder Behandlungskonzentration zum normalisierten Wert 1 sind direkt über der jeweiligen Säule eingetragen, Unterschiede zwischen den Konzentrationen als Balken. Signifikanzniveaus: \* = p < 0,001; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,001. Zur statistischen Auswertung der Western Blots, siehe Kapitel 2.3.8.



## 6.1.2 Proliferationsassays mit Tunicamycin (TM)

## Abbildung Anhang 2: Proliferation von RCC-Zelllinien mit veränderter Regulierung von ER-Stressproteinen gegen Kontrolle unter Cisplatin-Behandlung

Aufgetragen sind die zur unbehandelten (0  $\mu$ M Cisplatin) Kontrollgruppe (TM-Behandlung und Kontrollzellen) in Prozent angegebenen Ergebnisse des MTT-Tests von RCC-Zellen beider Zelllinien (A: A498, B: Caki-2) mit unveränderten oder hochregulierten ER-Stressproteinen (nach Behandlung mit Tunicamycin). Die Versuchsergebnisse sind als **Mittelwert mit Standardabweichung** angegeben. Signifikanzniveaus: \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001;

## 7 Literaturverzeichnis

Akaboshi M, Kawai K, Maki H, Akuta K, Ujeno Y, Miyahara T (1992): The number of platinum atoms binding to DNA, RNA and protein molecules of HeLa cells treated with cisplatin at its mean lethal concentration. Jpn J Cancer Res <u>83</u>, 522–526

Al-Rawashdeh FY, Scriven P, Cameron IC, Vergani PV, Wyld L (2010): Unfolded protein response activation contributes to chemoresistance in hepatocellular carcinoma. Eur J Gastroenterol Hepatol <u>22</u>, 1099–1105

American Cancer Society (2017): Cancer Facts & Figures 2017. American Cancer Society, Atlanta 2017 (https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf), Abrufdatum: 04.06.2019

Baksh S, Michalak M (1991): Expression of calreticulin in Escherichia coli and identification of its Ca2+ binding domains. J Biol Chem <u>266</u>, 21458–21465

Basu A, Krishnamurthy S (2010): Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. J Nucleic Acids 2010, 201367

Bergers G, Hanahan D (2008): Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. Nat Rev Cancer <u>8</u>, 592–603

Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D (2000): Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. Nat Cell Biol <u>2</u>, 326–332

Bibi A, Agarwal NK, Dihazi GH, Eltoweissy M, van Nguyen P, Mueller GA, Dihazi H (2011): Calreticulin is crucial for calcium homeostasis mediated adaptation and survival of thick ascending limb of Henle's loop cells under osmotic stress. Int J Biochem Cell Biol <u>43</u>, 1187–1197

Biden TJ, Boslem E, Chu KY, Sue N (2014): Lipotoxic endoplasmic reticulum stress,  $\beta$  cell failure, and type 2 diabetes mellitus. Trends Endocrinol Metab <u>25</u>, 389–398

Bini L, Magi B, Marzocchi B, Arcuri F, Tripodi S, Cintorino M, Sanchez JC, Frutiger S, Hughes G, Pallini V et al. (1997): Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue. Electrophoresis <u>18</u>, 2832–2841

Blanchard P, Bourhis J, Lacas B, Posner MR, Vermorken JB, Cruz Hernandez JJ, Bourredjem A, Calais G, Paccagnella A, Hitt R et al. (2013): Taxane-cisplatin-fluorouracil as induction chemotherapy in locally advanced head and neck cancers: an individual patient data meta-analysis of the meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer group. J Clin Oncol <u>31</u>, 2854–2860 Brewer JW, Diehl JA (2000): PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response. Proc Natl Acad Sci U S A <u>97</u>, 12625–12630

Buti S, Bersanelli M, Sikokis A, Maines F, Facchinetti F, Bria E, Ardizzoni A, Tortora G, Massari F (2013): Chemotherapy in metastatic renal cell carcinoma today? A systematic review. Anticancer Drugs <u>24</u>, 535–554

Butler BP, Novick AC, Miller DP, Campbell SA, Licht MR (1995): Management of small unilateral renal cell carcinomas: radical versus nephron-sparing surgery. Urology <u>45</u>, 34-40

Chen C-N, Chang C-C, Su T-E, Hsu W-M, Jeng Y-M, Ho M-C, Hsieh F-J, Lee P-H, Kuo M-L, Lee H et al. (2009): Identification of calreticulin as a prognosis marker and angiogenic regulator in human gastric cancer. Ann Surg Oncol <u>16</u>, 524–533

Chiang W-F, Hwang T-Z, Hour T-C, Wang L-H, Chiu C-C, Chen H-R, Wu Y-J, Wang C-C, Wang L-F, Chien C-Y et al. (2013): Calreticulin, an endoplasmic reticulum-resident protein, is highly expressed and essential for cell proliferation and migration in oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol <u>49</u>, 534–541

Chou H-C, Chen J-Y, Lin D-Y, Wen Y-F, Lin C-C, Lin S-H, Lin C-H, Chung T-W, Liao E-C, Chen Y-J et al. (2015): Identification of Up- and Down-Regulated Proteins in Pemetrexed-Resistant Human Lung Adenocarcinoma: Flavin Reductase and Calreticulin Play Key Roles in the Development of Pemetrexed-Associated Resistance. J Proteome Res 14, 4907–4920

Coling DE, Ding D, Young R, Lis M, Stofko E, Blumenthal KM, Salvi RJ (2007): Proteomic analysis of cisplatin-induced cochlear damage: Methods and early changes in protein expression. Hear Res <u>226</u>, 140–156

Coppolino MG, Woodside MJ, Demaurex N, Grinstein S, St-Arnaud R, Dedhar S (1997): Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion. Nature <u>386</u>, 843–847

Corazzari M, Lovat PE, Armstrong JL, Fimia GM, Hill DS, Birch-Machin M, Redfern CPF, Piacentini M (2007): Targeting homeostatic mechanisms of endoplasmic reticulum stress to increase susceptibility of cancer cells to fenretinide-induced apoptosis: The role of stress proteins ERdj5 and ERp57. Br J Cancer <u>96</u>, 1062–1071

Corbett EF, Michalak M (2000): Calcium, a signaling molecule in the endoplasmic reticulum? Trends Biochem Sci <u>25</u>, 307–311

Daneshmand S, Quek ML, Lin E, Lee C, Cote RJ, Hawes D, Cai J, Groshen S, Lieskovsky G, Skinner DG et al. (2007): Glucose-regulated protein GRP78 is up-regulated in prostate cancer and correlates with recurrence and survival. Hum Pathol <u>38</u>, 1547–1552

Dentino M, Luft FC, Yum MN, Williams SD, Einhorn LH (1978): Long term effect of Cis-Diamminedichloride platinum (CDDP) on renal function and structure in man. Cancer <u>41</u>, 1274–1281

Dihazi H, Dihazi GH, Bibi A, Eltoweissy M, Mueller CA, Asif AR, Rubel D, Vasko R, Mueller GA (2013): Secretion of ERP57 is important for extracellular matrix accumulation and progression of renal fibrosis, and is an early sign of disease onset. J Cell Sci <u>126</u>, 3649– 3663

Dobson CM (2003): Protein folding and misfolding. Nature 426, 884-890

Du X-L, Hu H, Lin D-C, Xia S-H, Shen X-M, Zhang Y, Luo M-L, Feng Y-B, Cai Y, Xu X et al. (2007): Proteomic profiling of proteins dysregulted in Chinese esophageal squamous cell carcinoma. J Mol Med <u>85</u>, 863–875

Du X-L, Yang H, Liu S-G, Luo M-L, Hao J-J, Zhang Y, Lin D-C, Xu X, Cai Y, Zhan Q-M et al. (2009): Calreticulin promotes cell motility and enhances resistance to anoikis through STAT3-CTTN-Akt pathway in esophageal squamous cell carcinoma. Oncogene <u>28</u>, 3714–3722

Eastman A (1987): The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. Pharmacol Ther <u>34</u>, 155–166

Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M (2008): The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. Endocr Rev <u>29</u>, 42–61

Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, Chevreau C, Filipek M, Melichar B, Bajetta E et al. (2007): Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: A randomised, double-blind phase III trial. Lancet <u>370</u>, 2103–2111

Feng R, Zhai WL, Yang HY, Jin H, Zhang QX (2011): Induction of ER stress protects gastric cancer cells against apoptosis induced by cisplatin and doxorubicin through activation of p38 MAPK. Biochem Biophys Res Commun <u>406</u>, 299–304

Feng R, Ye J, Zhou C, Qi L, Fu Z, Yan B, Liang Z, Li R, Zhai W (2015): Calreticulin down-regulation inhibits the cell growth, invasion and cell cycle progression of human hepatocellular carcinoma cells. Diagn Pathol <u>10</u>, 149

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015): Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer <u>136</u>, E359-86

Flanigan RC, Mickisch G, Sylvester R, Tangen C, van Poppel H, Crawford ED (2004): Cytoreductive nephrectomy in patients with metastatic renal cancer: a combined analysis. J Urol <u>171</u>, 1071–1076 Fliegel L, Burns K, MacLennan DH, Reithmeier RA, Michalak M (1989): Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. J Biol Chem <u>264</u>, 21522–21528

Fu W, Wu X, Li J, Mo Z, Yang Z, Huang W, Ding Q (2010): Upregulation of GRP78 in renal cell carcinoma and its significance. Urology <u>75</u>, 603–607

Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G (2012): Molecular mechanisms of cisplatin resistance. Oncogene <u>31</u>, 1869–1883

Gao B, Adhikari R, Howarth M, Nakamura K, Gold MC, Hill AB, Knee R, Michalak M, Elliott T (2002): Assembly and Antigen-Presenting Function of MHC Class I Molecules in Cells Lacking the ER Chaperone Calreticulin. Immunity <u>16</u>, 99–109

Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, Bratton DL, Oldenborg P-A, Michalak M, Henson PM (2005): Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. Cell <u>123</u>, 321–334

Go RS, Adjei AA (1999): Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. J Clin Oncol <u>17</u>, 409–422

Goldstein RS, Mayor GH (1983): The nephrotoxicity of cisplatin. Life Sci 32, 685-690

Gonzalez-Vitale JC, Hayes DM, Cvitkovic E, Sternberg SS (1977): The renal pathology in clinical trials of Cis-platinum (II) diamminedichloride. Cancer <u>39</u>, 1362–1371

Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D (2000): Perk Is Essential for Translational Regulation and Cell Survival during the Unfolded Protein Response. Mol Cell <u>5</u>, 897–904

Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K (1999): Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. Mol Biol Cell <u>10</u>, 3787–3799

Heng DYC, Xie W, Regan MM, Warren MA, Golshayan AR, Sahi C, Eigl BJ, Ruether JD, Cheng T, North S et al. (2009): Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study. J Clin Oncol <u>27</u>, 5794–5799

Herold G: Innere Medizin 2017: Eine vorlesungsorientierte Darstellung unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Gerd Herold, Köln 2017 Higa A, Taouji S, Lhomond S, Jensen D, Fernandez-Zapico ME, Simpson JC, Pasquet J-M, Schekman R, Chevet E (2014): Endoplasmic reticulum stress-activated transcription factor ATF6α requires the disulfide isomerase PDIA5 to modulate chemoresistance. Mol Cell Biol <u>34</u>, 1839–1849

Hsieh KP, Wilke N, Harris A, Miles MF (1996): Interaction of ethanol with inducers of glucose-regulated stress proteins. Ethanol potentiates inducers of grp78 transcription. J Biol Chem <u>271</u>, 2709–2716

Huang G, Sun Z, Wu J, Shui S, Han X, Guo D, Li T (2016): Calreticulin Promotes Proliferation and Migration But Inhibits Apoptosis in Schwann Cells. Med Sci Monit <u>22</u>, 4516– 4522

Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I et al. (2007): Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. N Engl J Med <u>356</u>, 2271–2281

Jamieson ER, Lippard SJ (1999): Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts. Chem Rev <u>99</u>, 2467–2498

Jonasch E, Gao J, Rathmell WK (2014): Renal cell carcinoma. BMJ 349, g4797

Kageyama S, Isono T, Iwaki H, Wakabayashi Y, Okada Y, Kontani K, Yoshimura K, Terai A, Arai Y, Yoshiki T (2004): Identification by proteomic analysis of calreticulin as a marker for bladder cancer and evaluation of the diagnostic accuracy of its detection in urine. Clin Chem <u>50</u>, 857–866

Kartalou M, Essigmann JM (2001): Mechanisms of resistance to cisplatin. Mutat Res <u>478</u>, 23–43

Kaufman RJ (1999): Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. Genes Dev <u>13</u>, 1211–1233

Kausch I, Jiang H, Thode B, Doehn C, Krüger S, Jocham D (2005): Inhibition of bcl-2 enhances the efficacy of chemotherapy in renal cell carcinoma. Eur Urol <u>47</u>, 703–709

Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, Them NCC, Berg T, Gisslinger B, Pietra D et al. (2013): Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. N Engl J Med <u>369</u>, 2379–2390

Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J (1988): The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. Nature <u>332</u>, 462–464

Krause K-H, Michalak M (1997): Calreticulin. Cell 88, 439-443

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature <u>227</u>, 680–685

Lee AS (1987): Coordinated regulation of a set of genes by glucose and calcium ionophores in mammalian cells. Trends Biochem Sci <u>12</u>, 20–23

Lee AS (2001): The glucose-regulated proteins: Stress induction and clinical applications. Trends Biochem Sci <u>26</u>, 504–510

Lee HK, Xiang C, Cazacu S, Finniss S, Kazimirsky G, Lemke N, Lehman NL, Rempel SA, Mikkelsen T, Brodie C (2008): GRP78 is overexpressed in glioblastomas and regulates glioma cell growth and apoptosis. Neuro-oncology <u>10</u>, 236–243

Leitlinienprogramm Onkologie 2017 (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): AWMF - S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms der Deutschen Krebsgesellschaft, Deutschen Krebshilfe und AWMF. (https://www.awmf.org/uploads/tx\_szleitlinien/043-017Ol-l\_S3\_Nierenzellkarzinom\_2017-04-verlaengert.pdf), Abrufdatum: 01.06.2019

Li M, Baumeister P, Roy B, Phan T, Foti D, Luo S, Lee AS (2000): ATF6 as a Transcription Activator of the Endoplasmic Reticulum Stress Element: Thapsigargin Stress-Induced Changes and Synergistic Interactions with NF-Y and YY1. Mol Cell Biol <u>20</u>, 5096–5106

Li WW, Alexandre S, Cao X, Lee AS (1993): Transactivation of the grp78 promoter by Ca2+ depletion. A comparative analysis with A23187 and the endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase inhibitor thapsigargin. J Biol Chem <u>268</u>, 12003–12009

Lilleby W, Fosså SD (2005): Chemotherapy in metastatic renal cell cancer. World J Urol <u>23</u>, 175–179

Lin Y, Wang Z, Liu L, Chen L (2011): Akt is the downstream target of GRP78 in mediating cisplatin resistance in ER stress-tolerant human lung cancer cells. Lung Cancer <u>71</u>, 291– 297

Liu C-C, Leclair P, Yap SQ, Lim CJ (2013): The membrane-proximal KXGFFKR motif of  $\alpha$ -integrin mediates chemoresistance. Mol Cell Biol <u>33</u>, 4334–4345

Liu CY, Schröder M, Kaufman RJ (2000): Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum. J Biol Chem <u>275</u>, 24881–24885

Liu CY, Xu Z, Kaufman RJ (2003): Structure and intermolecular interactions of the luminal dimerization domain of human IRE1alpha. J Biol Chem <u>278</u>, 17680–17687

Liu H, Baliga R (2005): Endoplasmic reticulum stress-associated caspase 12 mediates cisplatin-induced LLC-PK1 cell apoptosis. J Am Soc Nephrol <u>16</u>, 1985–1992 Liu X, Sun N, Dong Y, Li J, Liu Y, Ren Y, Yang C, Zhang L, Zhou Y, Tong Z et al. (2015): Anticancer effects of adenovirus-mediated calreticulin and melanoma-associated antigen 3 expression on non-small cell lung cancer cells. Int Immunopharmacol <u>25</u>, 416–424

Lu C-M, Lin J-J, Huang H-H, Ko Y-C, Hsu J-L, Chen J-C, Din Z-H, Wu Y-J (2014): A panel of tumor markers, calreticulin, annexin A2, and annexin A3 in upper tract urothelial carcinoma identified by proteomic and immunological analysis. BMC Cancer <u>14</u>, 363

Lu Y-C, Chen C-N, Wang B, Hsu W-M, Chen S-T, Chang K-J, Chang C-C, Lee H (2011): Changes in tumor growth and metastatic capacities of J82 human bladder cancer cells suppressed by down-regulation of calreticulin expression. Am J Pathol <u>179</u>, 1425–1433

Lwin Z-M, Guo C, Salim A, Yip GW-C, Chew F-T, Nan J, Thike AA, Tan P-H, Bay B-H (2010): Clinicopathological significance of calreticulin in breast invasive ductal carcinoma. Mod Pathol <u>23</u>, 1559–1566

Maase H von der, Hansen SW, Roberts JT, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, Bodrogi I, Albers P, Knuth A, Lippert CM et al. (2000): Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. J Clin Oncol <u>18</u>, 3068– 3077

Mandic A, Hansson J, Linder S, Shoshan MC (2003): Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. J Biol Chem <u>278</u>, 9100–9106

Martin S, Lamb HK, Brady C, Lefkove B, Bonner MY, Thompson P, Lovat PE, Arbiser JL, Hawkins AR, Redfern CPF (2013): Inducing apoptosis of cancer cells using small-molecule plant compounds that bind to GRP78. Br J Cancer <u>109</u>, 433–443

Martin S, Lovat PE, Redfern CPF (2015): Cell-type variation in stress responses as a consequence of manipulating GRP78 expression in neuroectodermal cells. J Cell Biochem <u>116</u>, 438–449

Martins I, Kepp O, Schlemmer F, Adjemian S, Tailler M, Shen S, Michaud M, Menger L, Gdoura A, Tajeddine N et al. (2011): Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress. Oncogene <u>30</u>, 1147–1158

Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M (1999): Calreticulin: one protein, one gene, many functions. Biochem J <u>344 Pt 2</u>, 281–292

Michalak M, Robert Parker JM, Opas M (2002): Ca2+ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. Cell Calcium <u>32</u>, 269–278

Michaud M, Sukkurwala AQ, Di Sano F, Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G (2014): Synthetic induction of immunogenic cell death by genetic stimulation of endoplasmic reticulum stress. Oncoimmunology <u>3</u>, e28276 Mickisch GH (1994): Chemoresistance of renal cell carcinoma: 1986-1994. World J Urol 12, 214–223

Mickisch G, Bier H, Bergler W, Bak M, Tschada R, Alken P (1990): P-170 glycoprotein, glutathione and associated enzymes in relation to chemoresistance of primary human renal cell carcinomas. Urol Int <u>45</u>, 170–176

Mickisch G, Carballido J, Hellsten S, Schulze H, Mensink H (2001a): Guidelines on Renal Cell Cancer. Eur Urol <u>40</u>, 252–255

Mickisch GH, Garin A, van Poppel H, Prijck L de, Sylvester R (2001b): Radical nephrectomy plus interferon-alfa-based immunotherapy compared with interferon alfa alone in metastatic renal-cell carcinoma: a randomised trial. Lancet <u>358</u>, 966–970

Miller L (2010): Analyzing gels and western blots with ImageJ (http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/), Abrufdatum: 12.10.2017

Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM (1996): Renal-cell carcinoma. N Engl J Med <u>335</u>, 865–875

Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, Grünwald V, Thompson JA, Figlin RA, Hollaender N et al. (2008): Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: A double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. Lancet <u>372</u>, 449–456

Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, Tykodi SS, Sosman JA, Procopio G, Plimack ER et al. (2015): Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. N Engl J Med <u>373</u>, 1803–1813

Nakajo S, Okamoto M, Masuda Y, Sakai I, Ohsawa S, Nakaya K (1996): Geranylgeraniol causes a decrease in levels of calreticulin and tyrosine phosphorylation of a 36-kDa protein prior to the appearance of apoptotic features in HL-60 cells. Biochem Biophys Res Commun <u>226</u>, 741–745

Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, Avezov E, Li J, Kollmann K, Kent DG et al. (2013): Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. N Engl J Med <u>369</u>, 2391–2405

Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini J-L, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N et al. (2007): Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. Nat Med <u>13</u>, 54–61

Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K (2002): Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. Biochem J <u>366</u>, 585–594

Olden K, Pratt RM, Jaworski C, Yamada KM (1979): Evidence for role of glycoprotein carbohydrates in membrane transport: specific inhibition by tunicamycin. Proc Natl Acad Sci U S A <u>76</u>, 791–795

Ostwald TJ, MacLennan DH (1974): Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. J Biol Chem <u>249</u>, 974–979

Panaretakis T, Joza N, Modjtahedi N, Tesniere A, Vitale I, Durchschlag M, Fimia GM, Kepp O, Piacentini M, Froehlich K-U et al. (2008): The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. Cell Death Differ <u>15</u>, 1499–1509

Perez RP (1998): Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. Eur J Cancer 34, 1535–1542

Peyrou M, Cribb AE (2007): Effect of endoplasmic reticulum stress preconditioning on cytotoxicity of clinically relevant nephrotoxins in renal cell lines. Toxicol In Vitro <u>21</u>, 878– 886

Peyrou M, Hanna PE, Cribb AE (2007): Cisplatin, gentamicin, and p-aminophenol induce markers of endoplasmic reticulum stress in the rat kidneys. Toxicol Sci <u>99</u>, 346–353

Rao RV, Bredesen DE (2004): Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. Curr Opin Cell Biol <u>16</u>, 653–662

RKI, GEKID (2015): Krebs in Deutschland 2011/2012 (Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes). Robert Koch-Institut, Berlin 2015

Rodriguez-Vida A, Hutson TE, Bellmunt J, Strijbos MH (2017): New treatment options for metastatic renal cell carcinoma. ESMO Open <u>2</u>, e000185

Rojiani MV, Finlay BB, Gray V, Dedhar S (1991): In vitro interaction of a polypeptide homologous to human Ro/SS-A antigen (calreticulin) with a highly conserved amino acid sequence in the cytoplasmic domain of integrin alpha subunits. Biochemistry <u>30</u>, 9859–9866

Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T (1965): Inhibition of cell division in division in Escherichia Coli by electrolysis products from a platinum electrode. Nature <u>205</u>, 698–699

Rovetta F, Stacchiotti A, Consiglio A, Cadei M, Grigolato PG, Lavazza A, Rezzani R, Aleo MF (2012): ER signaling regulation drives the switch between autophagy and apoptosis in NRK-52E cells exposed to cisplatin. Exp Cell Res <u>318</u>, 238–250

Rutkowski DT, Kaufman RJ (2004): A trip to the ER: Coping with stress. Trends Cell Biol 14, 20–28

Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, Mori K, Sadighi Akha AA, Raden D, Kaufman RJ (2006): Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. PLoS Biol <u>4</u>, e374

Sachdeva K, Jana B R P, Curti B (2017): Renal Cell Carcinoma (http://emedicine.medscape.com/article/281340-overview#showall), zuletzt aktualisiert: 03.04.2017, Abrufdatum: 21.08.2017

Selkoe DJ (2003): Folding proteins in fatal ways. Nature 426, 900-904

Shang J, Lehrman MA (2004): Discordance of UPR signaling by ATF6 and Ire1p-XBP1 with levels of target transcripts. Biochem Biophys Res Commun <u>317</u>, 390–396

Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R (2002): ER Stress Regulation of ATF6 Localization by Dissociation of BiP/GRP78 Binding and Unmasking of Golgi Localization Signals. Dev Cell <u>3</u>, 99–111

Sheng W, Chen C, Dong M, Zhou J, Liu Q, Dong Q, Li F (2014): Overexpression of calreticulin contributes to the development and progression of pancreatic cancer. J Cell Physiol 229, 887–897

Sherman S, Gibson D, Wang A, Lippard S (1985): X-ray structure of the major adduct of the anticancer drug cisplatin with DNA: Cis-[Pt(NH3)2(d(pGpG))]. Science <u>230</u>, 412–417

Shi F, Shang L, Pan B-Q, Wang X-M, Jiang Y-Y, Hao J-J, Zhang Y, Cai Y, Xu X, Zhan Q-M et al. (2014): Calreticulin promotes migration and invasion of esophageal cancer cells by upregulating neuropilin-1 expression via STAT5A. Clin Cancer Res <u>20</u>, 6153–6162

Shuda M, Kondoh N, Imazeki N, Tanaka K, Okada T, Mori K, Hada A, Arai M, Wakatsuki T, Matsubara O et al. (2003): Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: A possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. J Hepatol <u>38</u>, 605–614

Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2016): Cancer statistics, 2016. CA Cancer J Clin 66, 7-30

Smith MJ, Koch GL (1989): Multiple zones in the sequence of calreticulin (CRP55, calregulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protein. EMBO J <u>8</u>, 3581–3586

Spiro RG, Zhu Q, Bhoyroo V, Söling HD (1996): Definition of the lectin-like properties of the molecular chaperone, calreticulin, and demonstration of its copurification with endomannosidase from rat liver Golgi. J Biol Chem <u>271</u>, 11588–11594

Subjeck JR, Shyy TT (1986): Stress protein systems of mammalian cells. Am J Physiol <u>250</u>, C1-17

Tesniere A, Schlemmer F, Boige V, Kepp O, Martins I, Ghiringhelli F, Aymeric L, Michaud M, Apetoh L, Barault L et al. (2010): Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. Oncogene <u>29</u>, 482–491

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A <u>76</u>, 4350–4354

Trivedi R, Dihazi GH, Eltoweissy M, Mishra DP, Mueller GA, Dihazi H (2016a): The antioxidant protein PARK7 plays an important role in cell resistance to Cisplatin-induced apoptosis in case of clear cell renal cell carcinoma. Eur J Pharmacol <u>784</u>, 99–110

Trivedi R, Müller GA, Rathore MS, Mishra DP, Dihazi H (2016b): Anti-Leukemic Activity of Shikonin: Role of ERP57 in Shikonin Induced Apoptosis in Acute Myeloid Leukemia. Cell Physiol Biochem <u>39</u>, 604–616

van Poppel H, Da Pozzo L, Albrecht W, Matveev V, Bono A, Borkowski A, Marechal J-M, Klotz L, Skinner E, Keane T et al. (2007): A prospective randomized EORTC intergroup phase 3 study comparing the complications of elective nephron-sparing surgery and radical nephrectomy for low-stage renal cell carcinoma. Eur Urol <u>51</u>, 1606–1615

Vatolin S, Phillips JG, Jha BK, Govindgari S, Hu J, Grabowski D, Parker Y, Lindner DJ, Zhong F, Distelhorst CW et al. (2016): Novel Protein Disulfide Isomerase Inhibitor with Anticancer Activity in Multiple Myeloma. Cancer Res <u>76</u>, 3340–3350

Virrey JJ, Dong D, Stiles C, Patterson JB, Pen L, Ni M, Schönthal AH, Chen TC, Hofman FM, Lee AS (2008): Stress chaperone GRP78/BiP confers chemoresistance to tumor-associated endothelial cells. Mol Cancer Res <u>6</u>, 1268–1275

Wang J, Yin Y, Hua H, Li M, Luo T, Xu L, Wang R, Liu D, Zhang Y, Jiang Y (2009): Blockade of GRP78 sensitizes breast cancer cells to microtubules-interfering agents that induce the unfolded protein response. J Cell Mol Med <u>13</u>, 3888–3897

Waser M, Mesaeli N, Spencer C, Michalak M (1997): Regulation of Calreticulin Gene Expression by Calcium. J Cell Biol <u>138</u>, 547–557

Wit R de, Stoter G, Sleijfer DT, Neijt JP, Bokkel Huinink WW ten, Prijck L de, Collette L, Sylvester R (1998): Four cycles of BEP vs four cycles of VIP in patients with intermediateprognosis metastatic testicular non-seminoma: a randomized study of the EORTC Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group. European Organization for Research and Treatment of Cancer. Br J Cancer <u>78</u>, 828–832

Xu Q, Chen C, Lin A, Xie Y (2017): Endoplasmic reticulum stress-mediated membrane expression of CRT/ERp57 induces immunogenic apoptosis in drug-resistant endometrial cancer cells. Oncotarget <u>8</u>, 58754–58764 Xu Y, Yu H, Qin H, Kang J, Yu C, Zhong J, Su J, Li H, Sun L (2012): Inhibition of autophagy enhances cisplatin cytotoxicity through endoplasmic reticulum stress in human cervical cancer cells. Cancer Lett <u>314</u>, 232–243

Yoon GS, Lee H, Jung Y, Yu E, Moon HB, Song K, Lee I (2000): Nuclear matrix of calreticulin in hepatocellular carcinoma. Cancer Res <u>60</u>, 1117–1120

Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K (1998): Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. J Biol Chem <u>273</u>, 33741–33749

Yu H, Su J, Xu Y, Kang J, Li H, Zhang L, Yi H, Xiang X, Liu F, Sun L (2011): p62/SQSTM1 involved in cisplatin resistance in human ovarian cancer cells by clearing ubiquitinated proteins. Eur J Cancer <u>47</u>, 1585–1594

ZfKD: Datenbankabfrage zur Inzidenz des Nierenzellkarzinoms. Robert Koch-Institut (http://www.krebsdaten.de/Krebs/SiteGlobals/Forms/Datenbankabfrage/datenbankab-frage\_stufe2\_form.html), Datenstand: 03.11.2016, Abrufdatum: 13.08.2017

Zhang Q, Shi J, Yuan F, Wang H, Fu W, Pan J, Huang Y, Yu J, Yang J, Chen Z (2016): Higher expression of XPF is a critical factor in intrinsic chemotherapy resistance of human renal cell carcinoma. Int J Cancer <u>139</u>, 2827–2837