

Aus dem Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie
(Prof. Dr. med. G. Burckhardt)
im Zentrum Physiologie und Pathophysiologie
der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen

Einfluss des Transkriptionsfaktors B-cell lymphoma 6 (BCL6) auf die Expression renaler Transportproteine

INAUGURAL – DISSERTATION

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

vorgelegt von

Aline Noel Millé

aus

Otterndorf

Göttingen 2016

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Gerhard Burckhardt

II. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Mladen Tzvetkov

III. Berichterstatter: Prof. Dr. med. dent. Rainer Mausberg

Tag der mündlichen Prüfung: 07.11.2016

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Die Nieren | 1 |
| 1.2 | Das Nierenzellkarzinom | 2 |
| 1.2.1 | Chemoresistenz des Nierenzellkarzinoms | 2 |
| 1.3 | Transportsysteme in Zellen | 2 |
| 1.4 | Efflux-Transporter | 3 |
| 1.4.1 | ABC-Transporter | 3 |
| 1.4.1.1 | Das <i>Multidrug-Resistance</i> -Protein 1 (MDR1) | 4 |
| 1.4.1.2 | Das <i>Multidrug-Resistance-associated</i> -Protein 2 (MRP2) | 4 |
| 1.5. | Influx-Transporter | 5 |
| 1.5.1. | Die SLC22-Familie | 5 |
| 1.5.1. | Die humanen Organische-Anionen-Transporter | 5 |
| 1.5.1.1. | Der humane Organische-Anionen-Transporter 1 (OAT1) | 6 |
| 1.5.1.2. | Der humane Organische-Anionen-Transporter 3 (OAT3) | 6 |
| 1.5.1.3. | Der humane Organische-Anionen-Transporter 4 (OAT4) | 7 |
| 1.5.1.4. | Der humane Organische-Anionen-Transporter 10 (OAT10) | 7 |
| 1.5.2. | Die humanen Organische-Kationen-Transporter | 8 |
| 1.5.2.1. | Der humane Organische-Kationen-Transporter 1 (OCT1) | 8 |
| 1.5.2.2. | Der humane Organische-Kationen-Transporter 2 (OCT2) | 8 |
| 1.5.2.3. | Der humane Organische-Kationen-Transporter 3 (OCT3) | 9 |
| 1.6. | Transkriptionsfaktoren | 9 |
| 1.6.1. | Transkriptionsfaktor B-cell lymphoma 6 (BCL6) | 9 |
| 1.7. | Aufgabenstellung und Zielsetzung | 11 |
| 2 | Material und Methoden | 13 |
| 2.1 | Material | 13 |
| 2.1.1 | Geräte | 13 |
| 2.1.2 | Verbrauchsmaterial | 14 |
| 2.1.3 | Verwendete Chemikalien | 15 |
| 2.1.4 | Medien, Lösungen, Puffer | 15 |
| 2.1.4.1 | Zellkulturmedien | 16 |
| 2.1.5 | Kits und Enzyme | 16 |
| 2.1.6 | Antikörper | 17 |
| 2.1.7 | Vektoren | 17 |
| 2.1.8 | Oligonukleotidprimer | 17 |
| 2.1.9 | TaqMan® Genexpressions-Assays | 17 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.1.10 | Software und Online-Datenbanken..... | 19 |
| 2.1.11 | Nierenkarzinomzelllinien | 19 |
| 2.2 | Methoden | 21 |
| 2.2.1 | Zellkultur | 21 |
| 2.2.2 | Bestimmung der Zellzahl..... | 21 |
| 2.2.3 | Aussaat der Zellen | 21 |
| 2.2.4 | Transfektionstechnik unter Verwendung der Lipofektamin-Methode..... | 22 |
| 2.2.5 | BCL6-Expressionsanalyse in Nierenkarzinomzelllinien | 22 |
| 2.2.5.1 | Isolierung und Aufreinigung der RNA..... | 22 |
| 2.2.5.2 | Reverse Transkription (cDNA-Synthese) | 23 |
| 2.2.5.3 | Polymerase-Kettenreaktion..... | 24 |
| 2.2.5.3.1 | PCR-Analyse | 25 |
| 2.2.5.4 | Agarosegel-Elektrophorese | 26 |
| 2.2.5.5 | Quantitative TaqMan® real-time PCR..... | 26 |
| 2.2.5.6 | Immunfluoreszenz | 28 |
| 2.2.6 | Untersuchung der Caspase-3-Aktivität | 29 |
| 2.2.7 | Proteinbestimmung nach Bradford | 29 |
| 2.2.8 | Statistische Auswertungen | 30 |
| 3. | Ergebnisse..... | 31 |
| 3.1. | Zellmorphologie und –wachstum..... | 31 |
| 3.2. | Nachweis des BCL6–Gens in Nierenkarzinomzelllinien..... | 32 |
| 3.2.1. | Nachweis des BCL6-Gens in der Zelllinie 786-O..... | 32 |
| 3.2.2. | Nachweis des BCL6-Gens in der Zelllinie ACHN..... | 33 |
| 3.2.3. | Nachweis des BCL6-Gens in der Zelllinie LN78 | 33 |
| 3.2.4. | Nachweis des BCL6-Gens in der Zelllinie RCCNG1 | 34 |
| 3.3. | Expression von SLC-Transportern und ABC-Transportern in Nierenkarzinomzelllinien | 34 |
| 3.3.1. | GAPDH-Expression unter Einfluss der BCL6-Überexpression | 35 |
| 3.3.2. | OATs und OCT1 in 786-O | 36 |
| 3.3.3. | OATs und OCT1 in ACHN..... | 36 |
| 3.3.4. | OATs und OCT1 in LN78 | 37 |
| 3.3.5. | OATs, OCTs, MRP2 und MDR1 in RCCNG1 | 38 |
| 3.3.6. | Zusammenfassung der real-time PCR-Analyse..... | 39 |
| 3.4. | Untersuchung des BCL6–Proteins | 40 |
| 3.5. | Der Effekt von BCL6 auf die Chemosensitivität der Nierenkarzinomzelllinie RCCNG1 | 42 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5.1. Der Einfluss von BCL6 auf die Chemosensitivität von RCCNG1-Zellen gegenüber 5-Fluorouracil | 43 |
| 3.5.2. Der Einfluss von BCL6 auf die Chemosensitivität von RCCNG1-Zellen gegenüber Irinotecan | 44 |
| 3.5.3. Der Einfluss von BCL6 auf die Chemosensitivität von RCCNG1-Zellen gegenüber Oxaliplatin | 45 |
| 4. Diskussion..... | 46 |
| 4.1. Nachweis des BCL6-Gens in den Nierenkarzinomzelllinien..... | 46 |
| 4.2. Beeinflussung der Expression renaler Transportproteine in 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1 durch BCL6..... | 47 |
| 4.2.1. Beeinflussung der Expression der Influx-Transporter in 7860-O, ACHN, LN78 und RCCNG1 durch BCL6 | 48 |
| 4.2.2. Beeinflussung der Expression der Efflux-Transporter MDR1 und MRP2 in RCCNG1 durch BCL6 | 51 |
| 4.3. Nachweis des BCL6-Proteins in den Nierenkarzinomzelllinien | 52 |
| 4.4. Einfluss des BCL6-Proteins auf die Chemosensitivität von RCCNG1-Zellen | 52 |
| 4.5. Einfluss weiterer Faktoren auf die Nierenkarzinomtherapie | 56 |
| 5. Zusammenfassung..... | 58 |
| 6. Anhang..... | 59 |
| 6.1. Abkürzungsverzeichnis | 59 |
| 6.2. Einheiten | 61 |
| 6.3. Abbildungsverzeichnis..... | 61 |
| 6.4. Tabellenverzeichnis..... | 62 |
| 7. Literaturverzeichnis | 63 |

1 Einleitung

1.1 Die Nieren

Die Nieren sind das wichtigste Ausscheidungsorgan des Körpers (Schmidt *et al.* 2010). Zu den Hauptaufgaben der Nieren zählen neben der Elimination harnpflichtiger Substanzen die Regulierung des Wasser- und Elektrolythaushaltes sowie die Regulation des Säure-Basen-Haushaltes (Klinke *et al.* 2010, Schmidt *et al.* 2010). Des Weiteren sind die Nieren an der langfristigen Blutdruckregulation, der Mineralisierung der Knochen sowie als endokrines Organ an der Bildung der Hormone Erythropoietin, Calcitriol und Renin beteiligt (Klinke *et al.* 2010). Nephrene bilden die funktionellen Grundeinheiten der Nieren. Jede Niere besitzt mehr als eine Million Nephrene (Klinke *et al.* 2010). Zu den fünf Hauptsegmenten eines Nephrons zählen der Glomerulus, der proximale Tubulus, die Henle-Schleife, der distale Tubulus und das Sammelrohr (Abbildung 1.1).

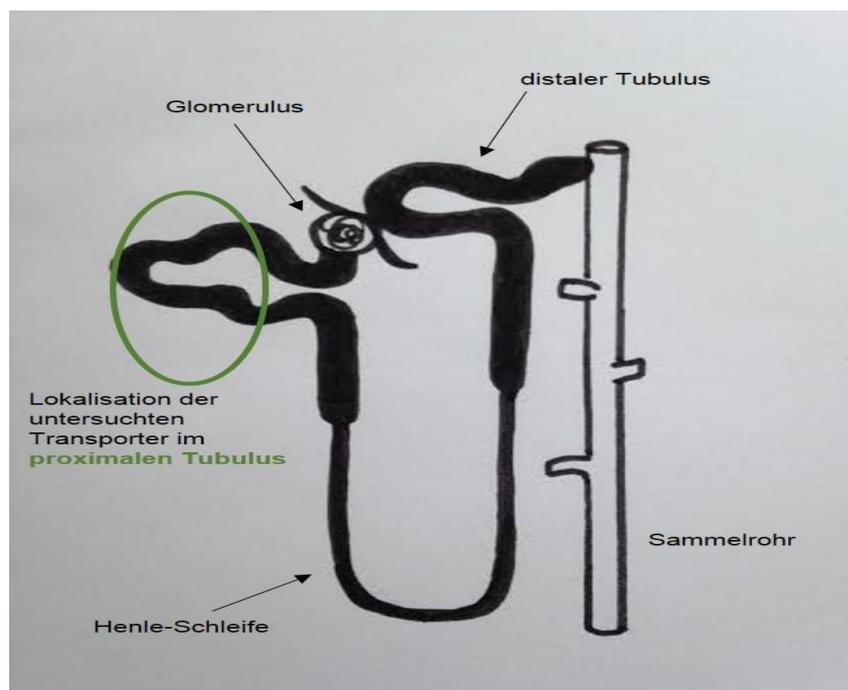


Abbildung 1.1: **Das Nephron.**

Die schematische Darstellung des Nephrons zeigt die fünf Hauptsegmente des Nephrons: den Glomerulus, den proximalen Tubulus, die Henle-Schleife, den distalen Tubulus und das Sammelrohr. Zusätzlich markiert die grüne Ellipse die Lokalisation der in dieser Arbeit untersuchten Transportproteine (eigene Darstellung).

1.2 Das Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom (NZK) ist ein Adenokarzinom und stellt derzeit etwa 3,8 % aller bösartigen Tumorerkrankungen (Koul *et al.* 2011) und 86 % aller malignen Nierenerkrankungen dar (Hautmann und Huland 2001). Damit gehört das NZK zu den zehn häufigsten bösartigen Tumoren der Welt (Ljungberg *et al.* 2011). Das Klärzellkarzinom, welches von den proximalen Tubuluszellen ausgeht, stellt mit etwa 70 % den häufigsten Typ des NZK dar (Goyal *et al.* 2013). Von dem überwiegend im fünften bis siebten Lebensjahrzehnt auftretenden Karzinom des proximalen Tubulus sind Männer doppelt so häufig betroffen wie Frauen (Hautmann und Huland 2001, Sültmann *et al.* 2005). Etwa ein Drittel der Patienten mit einem NZK weisen bei der Diagnosestellung bereits Metastasen auf. Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt bei diesen Patienten nach Motzer *et al.* weniger als 5 % (Motzer *et al.* 1996). In der Literatur werden je nach Ausdehnung der Tumorerkrankung verschiedene Therapiemöglichkeiten des NZK beschrieben.

Die radikale Tumornephrektomie, welche erstmals 1952 von Foley beschrieben wurde, stellt beim lokalisierten NZK die Behandlung der Wahl dar (Foley *et al.* 1952, Dempke 2006). Bei der radikalen Tumornephrektomie wird die erkrankte Niere zusammen mit dem umgebenden Gewebe (Nebenniere und Fettkapsel) entfernt. Das NZK gilt als chemo-, hormon- und strahlenresistenter Tumor (Dempke 2006, Hautmann und Huland 2001, Pal *et al.* 2015).

1.2.1 Chemoresistenz des Nierenzellkarzinoms

Zahlreiche Studien sowohl zu Mono- als auch Kombinationstherapien mit Chemotherapeutika als Behandlungskonzept zeigen, dass das NZK nur gering chemotherapiesensibel ist (George *et al.* 2002, Waters *et al.* 2004, Stadler *et al.* 2006). Komplette Remissionen des Tumors sind selten (Dutcher 2002). Eine maximale Remissionsrate von 16 % wird durch das Zytostatikum Vinblastin beschrieben (Dempke 2006). Die Ursache für die Chemoresistenz ist noch nicht vollständig geklärt (Walsh *et al.* 2009). Eine mögliche Erklärung für die verminderte Empfindlichkeit der Nierenkarzinomzellen gegenüber einem Zytostatikum ist der Heraustransport (Efflux) von Zytostatika aus den Tumorzellen (Sharom 2008, Gupta *et al.* 2011a). Die *ATP-binding cassette*-Transporter (ABC-Transporter) wurden in der Literatur im Hinblick auf die Chemosensibilität von Tumoren beschrieben (Nomura *et al.* 2005, Huang 2007, Walsh *et al.* 2009).

1.3 Transportsysteme in Zellen

Transportproteine spielen eine wichtige Rolle bezüglich der Funktion und Proliferation von Zellen sowie des Zelltodes, weil sie für den Influx und Efflux von Nährstoffen, Metaboliten und Pharmazeutika verantwortlich sind (Huang 2007).

Ohne Transporter könnten die meisten Stoffe die Lipiddoppelschicht der Zellmembran nicht passieren (Alberts *et al.* 2011). Membrantransportern werden im Organismus vielfältige Aufgaben und Funktionen der Resorption und Ausscheidung zugeschrieben. Sie sind dafür zuständig, dass Ionen oder hydrophile Substanzen die Lipiddoppelschicht der Zellmembran passieren können und stellen damit eine Verbindung zwischen Extra- und Intrazellularraum dar (Alberts *et al.* 2011).

Als Transportarten werden der passive Transport in Richtung des elektrochemischen Gradienten und der aktive Transport entgegen dem elektrochemischen Gradienten unterschieden (Alberts *et al.* 2011). Der aktive Transport kann nur durch die Kopplung mit einem zweiten energieliefernden Prozess erfolgen (Alberts *et al.* 2011). Primär aktiver Transport liegt vor, wenn ein Substrat unter Energieverbrauch transportiert wird. Die Energie dafür stammt von „primären“ Energiequellen wie z.B. die Hydrolyse von ATP zu ADP und Phosphat (Silbernagl und Despopoulos 2012). Zu den primär aktiven Transportern zählen die in dieser Arbeit untersuchten ABC-Transporter (Bergeron *et al.* 2008). Beim sekundär aktiven Transport wird die Energie indirekt verbraucht. Die potentielle Triebkraft eines bestehenden Konzentrationsgradienten, der zuvor durch ATP-Hydrolyse aufgebaut wurde, wird dazu genutzt, um eine Substanz entgegen ihrem Konzentrationsgradienten zu transportieren (Alberts *et al.* 2011). Zu diesem gekoppelten Transport zählen Symporter und Antiporter (Alberts *et al.* 2011). SLC-Transporter transportieren ihre Substrate passiv oder sekundär aktiv (Bergeron *et al.* 2008). Beim tertiär aktiven Transport liefert ein sekundär aktiver Transport den Antrieb (Schmidt *et al.* 2010).

Die Transportproteine lassen sich in Kanäle und Carrier einteilen (Alberts *et al.* 2011). Kanäle sind porenbildende Transmembranproteine und ermöglichen den passiven Transport (Bergeron *et al.* 2008, Alberts *et al.* 2011). Carrier haben Bindungsstellen für spezielle Substrate, ändern nach der Substratbindung ihre Konformation und transportieren das Substrat dadurch auf die andere Seite der Membran (Alberts *et al.* 2011). ABC- und SLC-Transporter werden zu den Carriern gezählt.

1.4 Efflux-Transporter

1.4.1 ABC-Transporter

Die Superfamilie der ABC-Transporter (ABC = *ATP-binding cassette*) stellt eine der größten Membranproteinfamilien dar (Hoffmann und Kroemer 2004), die von einer großen Genfamilie kodiert wird (Huang 2007) und erstmalig in Bakterien entdeckt wurde. ABC-Transporter sind durch membrandurchspannende Domänen und ATP-Bindungsdomänen gekennzeichnet (Hoffmann und Kroemer 2004). Durch die Hydrolyse von gebundenem ATP zu ADP

gewinnen die Transportproteine Energie für den aktiven Transport strukturell unterschiedlicher Substrate über eine Zellmembran (Dean und Allikmets 1995, Hoffmann und Kroemer 2004, Nomura *et al.* 2005). Diese ATP-getriebenen Transportsysteme exportieren Zytostatika und andere Substrate aus der Zelle und verhindern somit deren intrazelluläre Akkumulation. Da Efflux-Transporter als Gegenspieler der Influx-Transporter der SLC-Familie betrachtet werden, ist die Expression der Efflux-Transporter insbesondere im Rahmen der Chemotherapie zu berücksichtigen. Im Hinblick auf die Überwindung der Chemoresistenz von Karzinomzellen wurden in den letzten Jahren viele Untersuchungen an ABC-Transportern unternommen (Nomura *et al.* 2005, Shnitsar *et al.* 2009). Von den neun Mitgliedern der MRP-Proteine (ABCC) sind MRP4 und das in dieser Arbeit untersuchte MRP2 die wichtigsten Efflux-Transporter der Nieren (Masereeuw und Russel 2012).

1.4.1.1 Das Multidrug-Resistance-Protein 1 (MDR1)

Das *Multidrug-Resistance*-Protein 1 (MDR1; P-Glykoprotein, P=Permeabel) wurde erstmalig 1976 in einer Cholchicin-resistenten Zelllinie als Effluxtransporter detektiert (Huls *et al.* 2009). Zhou beschreibt MDR1 als einen der klinisch wichtigsten Membrantransporter (Zhou 2008). Der Transporter wird vorwiegend in der Leber, dem Intestinum, der Blut-Hirn-Schranke und den Nieren exprimiert (Huang 2007, Huls *et al.* 2009). In den Nieren ist MDR1 in der apikalen Membran proximaler Tubuli lokalisiert und für den Efflux von Substraten in den Primärharn verantwortlich (Masereeuw und Russel 2012). MDR1 interagiert insbesondere mit hydrophoben Medikamenten mit einer polyaromatischen Hauptkette und neutraler oder positiver Ladung (Huang 2007). Dazu gehören die Zytostatika Etoposid, Vinblastin und Adriamycin (Huang 2007). Neben den Zytostatika werden u.a. Antikonvulsiva, Calciumkanalantagonisten, Proteaseinhibitoren und antivirale Substanzen zu den Substraten von MDR1 gezählt (Masereeuw und Russel 2012).

1.4.1.2 Das Multidrug-Resistance-associated-Protein 2 (MRP2)

Das membranständige Glykoprotein wird vorzugsweise in der apikalen Plasmamembran von Hepatozyten, in proximalen Tubuluszellen der Nieren und im Intestinum exprimiert (Schaub *et al.* 1999, Chen und Tiwari 2011). Schaub *et al.* haben beobachtet, dass MRP2 in 95 % der Klarzellkarzinome der Nieren exprimiert wird (Schaub *et al.* 1999). Die Substratspezifität des Transportproteins beinhaltet ein breites Spektrum endogener und exogener organischer Anionen (Gerk und Vore 2002, Masereeuw und Russel 2012). Diese werden meist in der Zelle an Glucuronid oder Glutathion konjugiert und anschließend von MRP2 aus der Zelle transportiert (Hoffmann und Kroemer 2004). Methotrexat ist als Substrat von MRP2 beschrieben (Chen und Tiwari 2011, Masereeuw und Russel 2012). *In-vitro*- Studien konnten

zeigen, dass auch die Zytostatika Irinotecan, Cisplatin, Paclitaxel und Vincristin mit MRP2 interagieren (Chen und Tiwari 2011). Cui *et al.* zeigten, dass die Überexpression von MRP2 in transfizierten HEK-293 Zellen (Zellen humaner embryonaler Niere) die Resistenz gegenüber Cisplatin erhöht (Cui *et al.* 1999).

1.5. Influx-Transporter

1.5.1. Die SLC22-Familie

Die *solute carrier 22* (SLC22)-Genfamilie enthält fünf Typen von Transportproteinen, die Organische-Anionen-Transporter (OATs), die Organische-Kationen-Transporter (OCTs), Organische-Kationen/Carnitin-Transporter (OCTNs), die unbekanntes Substrat-Transporter (USTs) und Urat-Transporter (URATs) (Jonker und Schinkel 2004, Wu *et al.* 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurden von den Mitgliedern der SLC22-Familie die humanen Transporter OAT1, OAT3, OAT4, OAT10, OCT1, OCT2 und OCT3 untersucht. Es handelt sich dabei um Transmembranproteine, welche im Körper des Menschen vorwiegend in den Nieren und der Leber exprimiert werden (Jacobsson *et al.* 2007). Sie sind für die Aufnahme, die Verteilung und die Ausscheidung von Toxinen, endogenen Substanzen sowie Medikamenten inklusive Zytostatika verantwortlich (Jacobsson *et al.* 2007). Die Transporter enthalten 12 Transmembrandomänen mit intrazellulären N- und C-Termini und einem großen extrazellulären *Loop* zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne (Burckhardt und Wolff 2000). Im Gegensatz zu den ABC-Transportern, die in den letzten drei Jahrzehnten eingehend untersucht wurden, sind die Transporter der SLC22-Familie hinsichtlich der Chemoresistenz von Tumorzellen wenig erforscht und beschrieben (Gupta *et al.* 2011a).

1.5.1. Die humanen Organische-Anionen-Transporter

OATs werden in der Leber, den Nieren, der Plazenta, in der Blut-Hirn-Schranke und im Nasenepithel exprimiert (Burckhardt 2012). In den Nieren sind OATs in der Plasmamembran proximaler Tubuluszellen lokalisiert (Burckhardt und Burckhardt 2011, Burckhardt 2012). OATs sind polyspezifische Transporter (Burckhardt 2012), die sowohl mit negativ geladenen endogenen Metaboliten als auch einer Vielzahl von Pharmaka wie z.B. Antibiotika, antiviralen Wirkstoffen und Diuretika interagieren (Übersichten in: Burckhardt 2012, Emami Riedmaier *et al.* 2012).

1.5.1.1. Der humane Organische-Anionen-Transporter 1 (OAT1)

In den Nieren ist OAT1 (SLC22A6) in der basolateralen Membran des proximalen Tubulus lokalisiert und unter anderem für die Aufnahme von Arzneimitteln vom Blut in die Zelle verantwortlich (Burckhardt und Burckhardt 2011). Die Expression von OAT1 ist zwar in einer Vielzahl weiterer Gewebe wie zum Beispiel im Gehirn (Alebouyeh *et al.* 2003) und in der Plazenta (Koepsell und Endou 2004), beschrieben, doch in keinem anderen Organ ist die Expression von OAT1 so hoch wie in den Nieren (Hosoyamada *et al.* 1999, Sekine *et al.* 1997, Nishimura und Naito 2005). OAT1 ist ein Antiporter, der intrazelluläres α -Ketoglutarat gegen extrazelluläre organische Anionen und Xenobiotika austauscht (Burckhardt 2012). Die *para*-Aminohippursäure (PAH; Diagnostikum zur Untersuchung der Nierenfunktion) dient als Modell-Substrat zur Charakterisierung der OAT1-Funktion (Hosoyamada *et al.* 1999, Burckhardt 2012). OAT1 ist für seine umfassende Substratspezifität bekannt (Wright und Dantzer 2004) und interagiert mit mehr als hundert Substraten (Sekine *et al.* 2006). Dazu zählen endogene Substrate wie Dicarboxylate, Monocarboxylate, Urat und Hormone wie Prostaglandin E₂ und F_{2 α} (Sekine *et al.* 2006, Burckhardt und Burckhardt 2011, Burckhardt 2012). Außerdem wurde eine Interaktion von OAT1 mit ACE-Hemmern wie Captopril, Angiotensin-II-Rezeptor Blockern wie Olmesartan, Diuretika, Statinen, Urikosurika, Antibiotika wie Penicillin und Tetracyclin, antiviralen Medikamenten wie Acyclovir, nichtsteroidalen antiinflammatorischen Pharmaka wie z.B. Acetylsalicylsäure und Histamin-H₂-Rezeptor-Antagonisten wie Cimetidin nachgewiesen (Burckhardt 2012). Zudem ist bekannt, dass das Zytostatikum Methotrexat, ein Analogon der Folsäure (Vitamin B₉), mit OAT1 interagiert (Rizwan und Burckhardt 2007, Burckhardt und Burckhardt 2011, Burckhardt 2012).

1.5.1.2. Der humane Organische-Anionen-Transporter 3 (OAT3)

Das Gen für OAT3 (SLC22A8) ist auf dem Chromosom 11q12.3 neben dem Gen für OAT1 (SLC22A6) lokalisiert (Burckhardt 2012, Emami Riedmaier *et al.* 2012). Immunhistochemisch ist OAT3 in den Nieren genau wie OAT1 in der basolateralen Membran des proximalen Tubulus lokalisiert (Cha *et al.* 2001, Burckhardt 2012). Eine erhöhte Aktivität des OAT3-Promotors wurde in Anwesenheit von cAMP beschrieben (Ogasawara *et al.* 2006). Wegner *et al.* zeigten, dass der Transkriptionsfaktor BCL6 den Oat3-Promotor von Ratten aktiviert (Wegner *et al.* 2012). Motohashi *et al.* haben postuliert, dass OAT3 der in den humanen Nieren am stärksten exprimierte OAT sein könnte, da sie eine höhere Expression von OAT3-mRNA als von anderen OATs in den Nieren detektieren konnten (Motohashi *et al.* 2002). Andere Studien widerlegen diese Aussage, da z.B. Sakurai *et al.* (2004) und Hilgendorf *et al.* (2007) gleich viel oder mehr OAT1-mRNA nachweisen konnten. Ähnlich wie OAT1 fungiert OAT3 als Antiporter für α -Ketoglutarat gegen organische Anionen und ist auch durch eine

facettenreiche Substratspezifität gekennzeichnet (Emami Riedmaier *et al.* 2012). Einige Substratspezifitäten von OAT3 ähneln denen des OAT1 (Wright und Dantzer 2004), allerdings transportiert OAT3 lipophilere Substrate als OAT1 (Burckhardt und Burckhardt 2011, Emami Riedmaier *et al.* 2012). OAT3 transportiert eine Reihe endogener Substanzen wie z.B. cAMP, Cortisol, Prostaglandin E₂ und Urat (Emami Riedmaier *et al.* 2012). OAT3 interagiert auch mit einigen pharmakologischen Substanzen wie z.B. Diuretika, ACE-Inhibitoren, antiviralen Substanzen, Histamin-H₂-Rezeptor-Antagonisten, nichtsteroidalen antiinflammatorischen Medikamenten und Antibiotika wie Cephalosporine (Rizwan und Burckhardt 2007, Burckhardt und Burckhardt 2011, Burckhardt 2012, Emami Riedmaier *et al.* 2012). Cha *et al.* zeigten den OAT3-vermittelten Transport des Zytostatikums Methotrexat (Cha *et al.* 2001). Für das Zytostatikum Methotrexat weist OAT3 eine höhere Affinität als OAT1 auf (Burckhardt 2012). Bislang konnte nur am Oat3 von Mäusen ein Transport des in dieser Arbeit untersuchten Zytostatikums 5-Fluorouracil nachgewiesen werden (Kobayashi *et al.* 2004).

1.5.1.3. Der humane Organische-Anionen-Transporter 4 (OAT4)

Im Jahr 2000 berichteten Cha *et al.* erstmalig von der Isolierung des humanen Organische-Anionen-Transporters 4 (OAT4, SLC22A11) aus der Niere (Cha *et al.* 2000). OAT4 ist in der apikalen Membran, an der lumenwärts gerichteten Seite proximaler Tubuluszellen lokalisiert (Cha *et al.* 2000, Ekaratanawong *et al.* 2004) und in der Plazenta nachgewiesen (Cha *et al.* 2000). Hagos *et al.* konnten nachweisen, dass OAT4 sowohl als Efflux- als auch als Influx-Transporter arbeiten kann und bezeichneten OAT4 als asymmetrischen Antiporter, der α -Ketoglutarat gegen organische Anionen und Arzneistoffe in Influx- und Efflux-Richtung austauscht (Hagos *et al.* 2007). Die Resorption von organischen Anionen erfolgt demnach im Austausch gegen intrazelluläre Dicarboxylat- oder Hydroxylionen, die Sekretion von organischen Anionen erfolgt im Austausch gegen Chlorid aus dem Extrazellularraum (Burckhardt und Burckhardt 2011, Emami Riedmaier *et al.* 2012). OAT4 vermittelt den Influx von Östrogensulfat und Urat, DHEAS, Prostaglandin E₂ und Prostaglandin F_{2 α} sowie von Medikamenten wie z.B. Diuretika und Methotrexat (Hagos *et al.* 2007, Burckhardt und Burckhardt 2011, Burckhardt 2012). Ein bekanntes Efflux-Substrat ist PAH (Burckhardt 2012).

1.5.1.4. Der humane Organische-Anionen-Transporter 10 (OAT10)

OAT10 (SLC22A13) wird in der apikalen Membran der proximalen Tubuluszellen exprimiert (Bahn *et al.* 2008). Dieser Transporter hat eine besonders hohe Substratspezifität für das Vitamin Nicotinat (Bahn *et al.* 2008, Burckhardt und Burckhardt 2011). OAT10 vermittelt als

Antiporter den Austausch von Urat oder Nicotinat aus dem Extrazellularraum gegen intrazelluläres Laktat, Succinat oder Glutathion (Burckhardt 2012). Bahn *et al.* zeigten, dass OAT10 den Austausch organischer Anionen und nicht, wie seit seiner Isolierung als *organic cation transporter like 3* angenommen, organischer Kationen vermittelt (Bahn *et al.* 2008).

1.5.2. Die humanen Organische-Kationen-Transporter

Die Organische-Kationen-Transporter (OCTs) werden ebenfalls der Familie der SLC22-Transportproteine zugeordnet und sind überwiegend in den Nieren und in der Leber exprimiert (Burckhardt und Wolff 2000). OCT-Transportern wird in erster Linie die Vermittlung der hepatischen (OCT1) und der renalen Exkretion (OCT2 und OCT3) zugeschrieben. OCTs weisen eine Affinität für positiv geladene endogene Substanzen wie Adrenalin und Noradrenalin und für positiv geladene exogene Substanzen wie Methylphenylpyridinium (MPP+) und Tetraethylammoniumion (TEA) auf (Burckhardt und Wolff 2000). Der Transport durch OCT-Proteine erfolgt aktiv entlang eines Konzentrationsgradienten (Gupta *et al.* 2011a).

1.5.2.1. Der humane Organische-Kationen-Transporter 1 (OCT1)

OCT1 (SLC22A1) wurde 1997 aus der humanen Leber isoliert (Zhang *et al.* 1997). OCT1 ist hauptsächlich in der Leber exprimiert (Heise *et al.* 2012). In verschiedenen Studien konnte die Expression von OCT1 in Zellen von Kolonkarzinomen und Polypen nachgewiesen werden (Gupta *et al.* 2011a). OCT1 ist für die Aufnahme verschiedener sowohl endogener als auch exogener Substanzen verantwortlich und vermittelt den Transport der Zytostatika Irinotecan, Imatinib, Oxaliplatin, Picoplatin, Paclitaxel und Mitoxantron, welche sehr verschiedene Strukturen aufweisen (Zhang *et al.* 2006, Gupta *et al.* 2011a, Gupta *et al.* 2011b).

1.5.2.2. Der humane Organische-Kationen-Transporter 2 (OCT2)

OCT2 (SLC22A2) wurde 1997 in der humanen Niere identifiziert (Gorboulev *et al.* 1997). OCT2 wird in der basolateralen Membran des proximalen Tubulus exprimiert (Koepsell *et al.* 2003) und vermittelt dort die Eliminierung positiv geladener endogener und exogener Substanzen aus dem Blutplasma (Gupta *et al.* 2011a). Kitada *et al.* konnten in ihren Untersuchungen die Expression von OCT2 in Zellen des kolorektalen Karzinoms nachweisen (Kitada *et al.* 2008). OCT2 besitzt eine ähnliche Substratspezifität wie OCT1 (Übersicht in: Koepsell *et al.* 2007). OCT2 vermittelt u.a. den Transport des Antidiabetikums Metformin vom Blut in die proximalen Tubuluszellen (Chen *et al.* 2009). Cisplatin ist das bekannteste

Zytostatikum, welches vom OCT2 transportiert wird (Ciarimboli *et al.* 2005). Zudem vermittelt OCT2 den Transport von Oxaliplatin (Yonezawa *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2006) und Ifosfamid (Ciarimboli *et al.* 2011).

1.5.2.3. Der humane Organische-Kationen-Transporter 3 (OCT3)

OCT3 (SLC22A3) wird in vielen humanen Geweben exprimiert (Koepsell *et al.* 2003). OCT3 wurde unter anderem in den Nieren (Wu *et al.* 2000) und in der Plazenta (Sata *et al.* 2005) nachgewiesen. Shnitsar *et al.* konnten die Expression von OCT3 in Nierenkarzinomzelllinien detektieren (Shnitsar *et al.* 2009). OCT3 hat eine ähnliche Substratspezifität wie OCT1 und OCT2 (Übersicht in: Koepsell *et al.* 2007). OCT3 transportiert die Zytostatika Irinotecan, Oxaliplatin, Melphalan und Vincristin (Shnitsar *et al.* 2009, Gupta *et al.* 2011a).

1.6. Transkriptionsfaktoren

Die Initiation der Transkription stellt die wichtigste Stufe der Regulation der Genexpression dar (Löffler und Petrides 2014). Die Transkription von Genen wird durch Transkriptionsfaktoren reguliert (Campbell und Reece 2006, Fulton *et al.* 2009). Dabei handelt es sich um kleine Proteine, welche an spezifische Regionen der DNA binden und die Promotoren aktivieren oder reprimieren können (Liu *et al.* 1999). Auf diese Weise ermöglichen Transkriptionsfaktoren eine selektive Regulation und Expression von Genen. Innerhalb eines Promotors können viele verschiedene Transkriptionsfaktoren binden, da dieser mehrere Bindungsstellen umfasst.

1.6.1. Transkriptionsfaktor B-cell lymphoma 6 (BCL6)

Der Transkriptionsfaktor B-cell lymphoma 6 (BCL6) wurde in B-Zellen identifiziert und charakterisiert (Wagner *et al.* 2011). BCL6 wird beim Menschen im Keimzentrum der Lymphfollikel erhöht exprimiert (Dent *et al.* 2002, Basso und Dalla-Favera 2012). In ausgereiften Kardiomyozyten wurde die BCL6-Expression ebenfalls beschrieben (Altieri *et al.* 2012). In Mäusen konnte die BCL6-Expression unter anderem in der Leber (Zhang *et al.* 2012) und in Spermatozyten (Kojima *et al.* 2001) gezeigt werden. BCL6 spielt eine wichtige Rolle für die Embryonalentwicklung, die Immunantwort, die Lymphozytendifferenzierung und ist für die Zellzykluskontrolle unerlässlich (Staudt *et al.* 1999, Dent *et al.* 2002, Wagner *et al.* 2011, Basso und Dalla-Favera 2012). Eine der Hauptfunktionen von BCL6 ist die Repression der Transkription (Dent *et al.* 2002, Wagner *et al.* 2011, Basso und Dalla-Favera 2012). Als Repressor bindet BCL6 meistens direkt an dessen Konsensussequenz (Basso und Dalla-Favera 2012). Es ist ebenso möglich, dass BCL6 die Genexpression indirekt durch Protein-

Protein-Interaktionen mit weiteren Transkriptionsfaktoren reguliert (Dent *et al.* 2002). Durch die Änderung der BCL6-Expression werden transkriptionale Veränderungen zahlreicher Gene induziert, was eine Regulation von Signalwegen wie z.B. des Wnt-Signalwegs in der Zelle induzieren kann (Basso und Dalla-Favera 2012).

Das auf Chromosom 3q27 lokalisierte BCL6-Gen ist 24 kb lang und kodiert für ein Protein mit der molekularen Größe von 95 kDa (Ye *et al.* 1993, Chang *et al.* 1996, Dent *et al.* 2002). BCL6 gehört zur Familie der BTB/POZ/Zink-Finger (Bric à Brac/Tramtrack/Broad complex/POX Virus Zink-Finger) Transkriptionsfaktoren (Chang *et al.* 1996, Bereshchenko *et al.* 2002, Lemercier *et al.* 2002, Miles *et al.* 2005, Basso und Dalla-Favera 2012). Die BTB/POZ-Domäne befindet sich am Amino-Terminus (N-Terminus) und ist für die Protein-Protein-Interaktion sowie die Homo- und Heterodimerisierung des BCL6-Proteins essentiell (Miles *et al.* 2005, Costoya 2007, Basso und Dalla-Favera 2012). Der Mittelteil des BCL6-Proteins enthält drei PEST-Domänen (reich an Prolin, Glutaminsäure, Serin und Theronin) und ist an der Stabilität und Aktivität des Proteins beteiligt (Basso und Dalla-Favera 2012). Innerhalb dieses Mittelteils kann p300, ein Co-Aktivator, an das Protein binden und es durch Acetylierung inaktivieren (Bereshchenko *et al.* 2002). Am Carboxy-Terminus (C-Terminus) des BCL6-Proteins befindet sich die Zink-Finger-Domäne, welche aus sechs Zink-Fingern des Krüppel-Typs besteht und für die Protein-Protein-Interaktion von BCL6 und die sequenzspezifische DNA-Bindung verantwortlich ist (Miles *et al.* 2005, Basso und Dalla-Favera 2012).



Abbildung 1.2: **Schematische Darstellung des BCL6-Proteins.**

Dargestellt sind die drei funktionell bedeutendsten Protein-Domänen. Die N-terminale BTB/POZ-Domäne (Bric à Brac/Tramtrack/Broad complex/POX Virus Zink-Finger), welche für die Protein-Protein-Interaktion und Dimerisierung des Proteins verantwortlich ist, die PEST-Domänen, welche für die Aktivität und Stabilität des Proteins zuständig sind und die C-terminale Zink-Finger-Domäne. Die Zink-Finger-Domäne besteht aus sechs Zink-Fingern des Krüppel-Typs und ist für die DNA-Bindung und ebenfalls für die Protein-Protein-Interaktion verantwortlich (eigene Darstellung in Anlehnung an Basso und Dalla-Favera 2012, S. 173).

Wegner *et al.* haben erstmalig gezeigt, dass BCL6 geschlechtsabhängig in den Nieren von Ratten exprimiert wird (Wegner *et al.* 2012). Dabei wurde BCL6 in männlichen Ratten höher als in weiblichen exprimiert (Wegner *et al.* 2012). Bisher ist wenig darüber bekannt, welche Rolle BCL6 in Nierenkarzinomzellen ausüben könnte, da bisherige Untersuchungen hauptsächlich in B- und T-Zellen durchgeführt worden sind (Wagner *et al.* 2011, Basso und Dalla-Favera 2012). Erste Resultate über den Einfluss von BCL6 auf die Transportproteine in den Nierenzellen wurden von Wegner *et al.* (2012) und Wegner *et al.* (2014) veröffentlicht.

Dabei wurde BCL6 als möglicher geschlechtsabhängiger Regulator des Oat1 in Rattennieren identifiziert (Wegner *et al.* 2012). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass BCL6 die Genexpression des humanen OAT1 indirekt erhöhen kann (Wegner *et al.* 2014). Dieses Erkenntnis steht im Kontrast zu den bisherigen Publikationen, in denen BCL6 als Repressor-Protein der Transkription beschrieben wird (Chang *et al.* 1996, Lemerrier *et al.* 2002, Wagner *et al.* 2011, Basso und Dalla-Favera 2012).

1.7. Aufgabenstellung und Zielsetzung

Nierenkarzinomzellen sprechen auf die systemische Chemotherapie nur wenig an (Longo *et al.* 2007). Ein Teil der Chemoresistenz beruht auf dem Efflux von Zytostatikamolekülen aus den Karzinomzellen (Sharom 2008). Bis heute ist die Expression der Influx-Transportproteine in Karzinomzellen unzureichend bekannt. Die Expression von Influx-Transportern der SLC22-Familie in Nierenkarzinomzellen könnte die Ansammlung spezieller Zytostatika in den Karzinomzellen erhöhen und damit entscheidend zu einer erhöhten Chemosensitivität der Karzinomzellen beitragen (siehe Abbildung 1.3). Die Erforschung dieser Transporter ist für das Verständnis und die Therapie von Nierenzellkarzinomen von hoher Relevanz. Neben der Evaluierung der Expression von Influx-Transportern ist auch die Kenntnis über mögliche Beeinflussungsmöglichkeiten der Expression und das Verständnis über die Transporter-Zytostatika-Interaktionen zur zielgerichteten Chemotherapie von großer Bedeutung.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten ABC- und SLC-Transporter haben einen großen Einfluss auf die Pharmakokinetik von Medikamenten (Huang 2007). In den Experimenten wird untersucht, ob Efflux-Transporter wie die ABC-Transporter und Influx-Transporter wie die SLC-Transporter in Nierenkarzinomzelllinien exprimiert werden und ob sie einen Einfluss auf die Zytostatika-Resistenz dieser Zellen haben könnten.

Als Hauptziel dieser Arbeit gilt es zu untersuchen, ob der Transkriptionsfaktor BCL6 eine Rolle in der Expression von Transportproteinen in Nierenkarzinomzelllinien spielt und ob daraus resultierend die Chemosensitivität der Nierenkarzinomzellen erhöht werden kann.

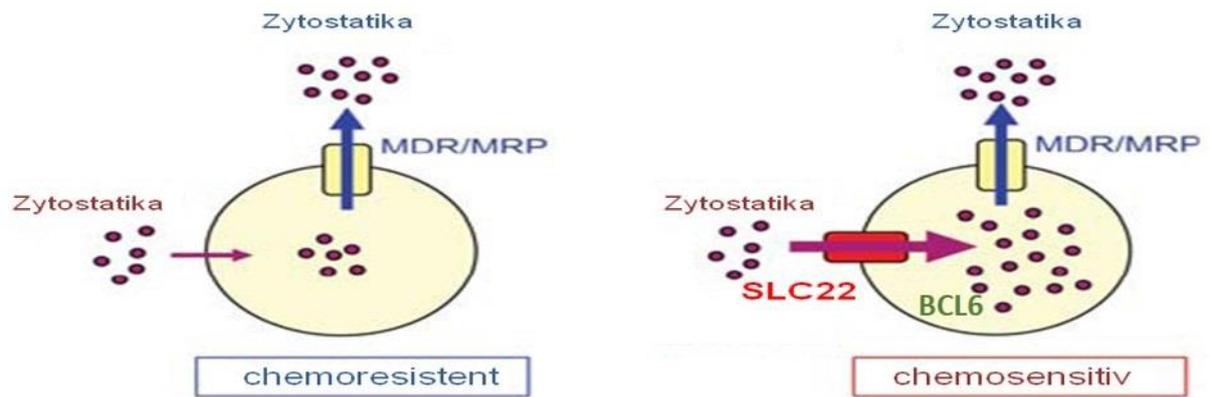


Abbildung. 1.3: Die Chemoresistenz der Nierenkarzinomzellen könnte durch gesteigerte Expression der **SLC22-Transporter** überwunden werden (modifiziert nach Gupta *et al.* 2011a).

Die Expression der SLC22-Transporter soll durch BCL6-Überexpression erhöht werden, damit diese Transporter Zytostatika vermehrt in die Karzinomzellen transportieren und eine erhöhte intrazelluläre Konzentration der Zytostatika bewirken.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Im folgenden Abschnitt werden die für die Durchführung der Experimente verwendeten Materialien und Geräte aufgeführt. Die verschiedenen Lösungen werden in ihren einzelnen Zusammensetzungen und Konzentrationen beschrieben.

2.1.1 Geräte

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit eingesetzten Geräte.

Tabelle 2.1: Geräte

| Gerät | Modell | Herkunft |
|-----------------------|---|---|
| Brutschrank | Function Line (Heraeus Jubile Edition) | Heraeus (Hanau, Deutschland) |
| Elektrophorese | Powersupply PPS 200-1D | MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) |
| Eismaschine | AF 10 | Scotsman Ice Systems (Herborn, Deutschland) |
| Feinwaage | 2002 MP1 | Sartorius (Göttingen, Deutschland) |
| Gefrierschrank -80 °C | Herafreeze | Heraeus (Hanau, Deutschland) |
| Gefrierschrank -20 °C | Premium no frost | Liebherr (Ochsenhausen, Deutschland) |
| Gelkammer | Midi | Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) |
| Geldokumentation | Gel Print 2000 I | Biophotonics (Ann Arbor, MI, USA) |
| Mikroplattenleser | Mithras LB 940 | Berthold Technologies (Bad Wildbad, Deutschland) |
| Mikroskop | Telaval 31 | Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland) |
| | Fluoreszenz-Mikroskop AXIO Observer D1 | Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland) |
| Mikroskopkamera | Powershot G2 | Canon Inc (Tokio, Japan) |
| Mikrowelle | Privileg 8521 | Quelle Schickedanz (Fürth, Deutschland) |
| Minizentrifuge | C-1200 | Labnet International (Woodbridge, NJ, USA) |
| PCR Cycler | C1000™ Thermal Cycler | Bio-Rad Laboratories, Inc (Hercules, CA, USA) |
| | PTC-200 Peltier Thermal Cycler | MJ Research (Waterfront, MA, USA) |
| real-time PCR Cycler | Mx3005p | Stratagene (Waldbronn, Deutschland) |

| | | |
|--|------------------------|---|
| RNA/DNA Calculator und Photometer | Gene Quant II | Pharmacia biotech (Cambridge, England) |
| Schüttler | KS 250 basic | IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland) |
| Vortex | MS1 Minishaker | IKA (Staufen, Deutschland) |
| Wasserbad | GFL | W. Krannich GmbH & Co KG (Göttingen, Deutschland) |
| Werkbank | Save 2000 | Thermo Scientific |
| Zählkammer (nach Neubauer) | Neubauer bright-line | Paul Marienfeld GmbH & Co KG (Lauda-Königshofen, Deutschland) |
| Zentrifugen | Megafuge 40 R | Heraeus (Hanau, Deutschland) |
| | Thermo Scientific 541D | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) |

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Die verwendeten Pipettenspitzen und Glasmaterialien wurden vor der Nutzung für 20 Minuten bei 120 °C autoklaviert. Für die Zellkultur wurden hauptsächlich Einwegartikel verwendet.

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterial

| Material | Hersteller |
|--|--|
| Deckgläschen | Menzel (Braunschweig, Deutschland) |
| Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml) | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Handschuhe | Meditrade (Kiefersfelden, Deutschland) |
| Pipettenspitzen | Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) |
| Kryoröhrchen (1,8 ml) | Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) |
| Röhre (15 ml, 50 ml) | Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) |
| Objektträger | Carl Roth® (Kralsruhe, Deutschland) |
| Zellkulturschalen (100x20mm) | Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) |
| Zellkulturplatten | Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) |

2.1.3 Verwendete Chemikalien

Tabelle 2.3: Verwendete Chemikalien

| Stoffbezeichnung | Hersteller |
|--|--|
| β -Mercaptoethanol | AppliChem (Darmstadt, Deutschland) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | AppliChem (Darmstadt, Deutschland) |
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium with high glucose (DMEM-HG) | Biochrom AG (Berlin, Deutschland) |
| Ethidiumbromid | Sigma-Aldrich® (Steinheim, Deutschland) |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | AppliChem (Darmstadt, Deutschland) |
| Formaldehyd | Carl Roth® (Karlsruhe, Deutschland) |
| Immersol™ 518 F | Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland) |
| Penicillin/Streptomycin (PEN-STREP) | PAA Laboratories GmbH (Cölbe, Deutschland) |
| Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) | AppliChem (Darmstadt, Deutschland) |
| Poly-D-Lysin-Hydrobromid | Sigma-Aldrich® (Steinheim, Deutschland) |
| NaCl | Merck (Darmstadt, Deutschland) |
| Trypsin | Biochrom AG (Berlin, Deutschland) |

2.1.4 Medien, Lösungen, Puffer

Alle Lösungen, Medien und Puffer wurden mit destilliertem H₂O angesetzt und, wenn nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur gelagert. Die folgende Tabelle (Tab. 2.4) fasst die verwendeten Substanzen zusammen.

Tabelle 2.4: Lösungen und Puffer

| Lösung, Puffer | Zusammensetzung /Hersteller, Produkt-Nr. |
|---|--|
| Agarosegel-Elektrophorese Ladepuffer 5x | 6,3 g Glycerol 2 ml 0,5 M Ethylendiamintetraacetat (EDTA) pH 8,0 50 μ l Trishydroxymethylaminomethan (Tris) HCl pH 7,6 0,001 % (w/v) Bromphenolblau 0,001 % (w/v) Xylencyanol FF mit nukleasefreiem aqua dest. auf 10 ml aufgefüllt |
| DNA Stopp (10 ml) | 5 ml Glycerol 2 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0 50 μ l 2 M Tris-HCl, pH 7.6 → zu 10 ml sterilem und filtriertem H ₂ O geben → wenige Kristalle Bromphenolblau zufügen → wenige Kristalle Xylencyanol FF zufügen |
| Ethidiumbromid (Stammlösung) | Sigma-Aldrich®, E1510 10 mg/ml in nukleasefreiem aqua dest. |
| PCR-Puffer (10x) | 500 mM KCl 100 mM Tris, pH 9.0 |

| | |
|--------------------------------------|---|
| | 15 mM MgCl ₂ 1 % Triton X-100 |
| PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) | Applichem, A0964 9,55 g in 1 l aqua dest. |
| Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer 5x | 54 g/l Tris-Base 27,5 g/l Borsäure 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,5 aufgefüllt auf 1 l mit aqua dest. |
| Trypsin-Lösung | 0,1 % Trypsin in PBS |

2.1.4.1 Zellkulturmedien

Die Zellkulturmedien wurden vor der Nutzung auf 37 °C vorgewärmt. Dem für die Zellkultur verwendeten zellspezifischen Kulturmedium Quantum 263 (mit L-Glutamin) wurden 100 U/ml Penicillin und 100 g/ml Streptomycin zugefügt. Für die transiente Transfektion wurden die Zellen im Quantum 263 Medium ohne antibiotische Zusätze 24 Stunden kultiviert.

Tabelle 2.5: **Zellkulturmedien**

| | |
|--|--|
| Dulbecco's Modified Eagle Medium with high glucose (DMEM-HG) | Biochrom AG (Berlin, Deutschland) |
| Quantum 263 (Tumorzellmedium mit L-Glutamin) | PAA Laboratories GmbH (Cölbe, Deutschland) |

2.1.5 Kits und Enzyme

Tabelle 2.6: **Kits und Enzyme**

| Kit/Enzym | Hersteller |
|---|--|
| EnzChek® Caspase-3 Assay Kit # 2 | Molecular probes® (Eugene, OR, USA) |
| Lipofectamine™ 2000 | Invitrogen™, Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) |
| RNeasy® Mini Kit (50) | Qiagen (Hilden, Deutschland) |
| Taq-Polymerase | in eigener Arbeitsgruppe hergestellt |
| Superscript®II Reverse Transkriptase | Invitrogen™, Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) |

2.1.6 Antikörper

Tabelle 2.7: Antikörper

| Antikörper | Hersteller |
|---|---|
| Alexa Fluor® 488 <i>goat anti-mouse</i> IgG (H+L) <i>Monoclonal mouse anti-human-BCL6</i> (H-12): sc-365618 | Invitrogen™, Life Technologies Santa Cruz® biotechnology |

2.1.7 Vektoren

Tabelle 2.8: Vektoren

| Name | Applikation, Anbieter |
|-------------|--|
| pcDNA3-BCL6 | Humaner BCL6 Expressionsvektor, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Giovanna Roncador, Monoclonal Antibodies Unit Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Spanien |
| pcDNA3 | Eukaryotischer Expressionsvektor, hergestellt, indem BCL6-cDNA aus dem Expressionsvektor pcDNA3-BCL6 entfernt wurde |

2.1.8 Oligonukleotidprimer

Tabelle 2.9: Oligonukleotidprimer

| Protein (Gen) | Primer | Sequenz 5'-3' | Produktlänge | Annealing Temperatur | Zyklen | Gel |
|---------------|----------|----------------------------|--------------|----------------------|--------|-------|
| GAPDH | 84_1for | TCACCATCTTCCAG GAGCG | 572 bp | 56 °C | 22 | 1,5 % |
| | 84_2rev | CTGCTTCACCACCT TCTTGA | | | | |
| BCL6 | 108_1for | CTTCTCAACCTTAAT CGTCTC | 91 bp | 53 °C | 30 | 2 % |
| | 108_2rev | CCGTTTTATGGGCT CTAAACTG | | | | |

2.1.9 TaqMan® Genexpressions-Assays

Die im Folgenden aufgeführten TaqMan® real-time PCR Assays wurden von Applied Biosystem (Foster City, CA, USA) bezogen.

Tabelle 2.10: Übersicht über die verwendeten TaqMan® Assays mit ihren Spleißvarianten

| Protein (Gen) | Assay | Spleißvariante |
|-----------------------------|---------------|---|
| GAPDH | Hs99999905_m1 | NM_002046.4 |
| BCL6 | Hs00277037_m1 | NM_001130845.1 NM_001134738.1 NM_001706.4 |
| OAT1 (SLC22A6) | Hs00537914_m1 | NM_004790.4 NM_153276.2 NM_153277.2 NM_153278.2 |
| OAT3 (SLC22A8) | Hs00188599_m1 | NM_001184732.1 NM_001184733.1 NM_001184736.1 NM_004254.3 |
| OAT10 (SLC22A13) | Hs00188605_m1 | NM_004256.3 |
| OAT4 (SLC22A11) | Hs00218486_m1 | NM_018484.2 |
| OCT1 (SLC22A1) | Hs00427554_m1 | NM_003057.2 |
| OCT2 (SLC22A2) | Hs00533907_m1 | NM_003058.3 |
| OCT3 (SLC22A3) | Hs00222691_m1 | NM_021977.3 |
| MDR1 (ABCB1) | Hs00184491_m1 | NM_000927.4 |
| MRP2 (ABCC2) | Hs00166123_m1 | NM_000392.3 |

2.1.10 Software und Online-Datenbanken

Tabelle 2.11: Software

| Programm | Verwendung | Hersteller |
|-----------------------------------|--|---|
| Axio Vision Rel. 4.6 | Fluoreszenz- Mikroskopie | Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland) |
| GraphPad Prism 4 | Statistische Überprüfung der Ergebnisse und Erstellung der Graphen | GraphPad Software, Inc. (La Jolla, CA, USA) |
| ImageJ 1.44 | Bildbearbeitung | Wayne Rasband |
| Microsoft Office 2007 | Daten- und Textverarbeitung | Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA) |
| MicroWin 2000 Version 4.41 | Messung der Fluoreszenz | Berthold Technologies (Bad Wildbad, Deutschland) |
| MxPro – Mx3000P | real-time PCR | Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland) |

Tabelle 2.12: Online-Datenbanken

| Name | Adresse |
|---|---|
| NCBI (National Center for Biotechnology Information) | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ |

2.1.11 Nierenkarzinomzelllinien

Die in den vorliegenden Untersuchungen verwendeten Nierenkarzinomzelllinien 786-O und ACHN wurden von ATCC (LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland) bezogen.

Die untersuchten Zelllinien LN78 und RCCNG1 stammen aus Biopsien von Nierenkarzinomen (durchgeführt in der Universitätsmedizin Göttingen, Abteilung Nephrologie und Rheumatologie). Sie wurden dem Institut freundlicherweise von Prof. Dr. Gerhard A. Müller und Prof. Dr. H. Dihazi aus der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie, Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung gestellt.

ACHN

ATCC Nummer: CRL-16112

Organismus: Homo sapiens (Zellen eines 22-jährigen kaukasischen Mannes)

Herkunft: Niere

Erkrankung: Adenokarzinom der Niere (Zellen stammen von der metastasierenden Seite: Pleuraerguss)

Wachstumsverhalten: adhärent

Morphologie: epithelial

LN78

Organismus: Homo sapiens (Zellen einer 73-jährigen Frau)

Herkunft: Niere

Erkrankung: Klarzellkarzinom der Niere

Wachstumsverhalten: adhärent

Morphologie: epithelial

RCCNG1

Organismus: Homo sapiens (Mann)

786-O

ATCC Nummer: CRL-1932

Organismus: Homo sapiens (Zellen eines 58-jährigen kaukasischen Mannes)

Herkunft: Niere

Erkrankung: Klarzellkarzinom der Niere

Wachstumsverhalten: adhärent

Morphologie: epithelial

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die verwendeten Nierenkarzinomzelllinien 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1 wurden unter sterilen Bedingungen in jeweils 10 ml des Kulturmediums Quantum 263 mit Penicillin/Streptomycin ausgesät und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Alle drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel, die Konfluenz der Zellen wurde alle zwei Tage lichtmikroskopisch kontrolliert. Bei 80-90 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium durch Absaugen entfernt, die Zellen mit 10 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS = *phosphate buffered saline*) gewaschen und anschließend mit 2 ml 0,1 %igem Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (EDTA) für zwei Minuten im CO₂-Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle des Ablösungsprozesses wurde die Reaktion mit 5 ml Kulturmedium gestoppt und die Zellsuspension mit den gelösten Zellen in ein Röhrchen überführt. Nach dem Zentrifugieren der Zellsuspension für fünf Minuten bei 1.000 Upm bei Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 1 ml Kulturmedium resuspendiert.

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Vor der weiteren Kultivierung wurde die Zelldichte mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 mit Zellkulturmedium verdünnt. Jeweils 10 µl der verdünnten Lösung wurden in die Neubauer-Zählkammer appliziert und lichtmikroskopisch ausgezählt. Die Glaskammer besitzt ein Raster, welches die Kammer in jeweils vier Quadranten einteilt. Jeder Quadrant besteht aus 16 Quadraten. Die aufgetragenen Zellen wurden in jedem einzelnen Quadranten gezählt. Anschließend wurde ein Mittelwert ermittelt. Dieser wurde mit dem Verdünnungs- und Kammerfaktor (10⁵) multipliziert. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte nach der folgenden Formel:

$$\frac{\text{Zellen je Quadrant}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor } 10^5 = \text{Zellzahl pro ml Zellsuspension}$$

2.2.3 Aussaat der Zellen

Für die Transfektion wurden die Zellen in 24-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Vor der Aussaat wurde die Zellzahl bestimmt. Da die ACHN-Zellen nur gering adhärent wachsen, wurden für diese Zelllinie Poly-D-Lysin-beschichtete 24-Well-Zellkulturplatten verwendet. Hierzu wurden die Platten mit einer 1 %igen Poly-D-Lysin-Lösung für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.4 Transfektionstechnik unter Verwendung der Lipofektamin-Methode

Um zu untersuchen, ob der Transkriptionsfaktor BCL6 einen Einfluss auf die Expressionen verschiedener Transportproteine und die Zytostatika-induzierte Apoptose der Nierenkarzinomzelllinien 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1 hat, wurden die Zellen transient mit BCL6 transfiziert. Die Transfektion wurde mit dem Leervektor pcDNA3 als Kontrolle und dem Expressionsvektor pcDNA3-BCL6 durchgeführt. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in einer 24-Well-Zellkulturplatte im Wachstumsmedium ohne Antibiotika ausgesät. Bei einer Konfluenz von etwa 70 % wurden die Zellen transient transfiziert. Dazu wurden die auf Eis gekühlten Plasmidvektoren pcDNA3 und pcDNA3-BCL6 mit dem Medium DMEM-HG (ohne FCS, ohne Penicillin/Streptomycin) verdünnt. Das Lipofektamin (Lipofectamine™ 2000, Invitrogen™ Life Technologies) wurde nach Herstellerangaben mit DMEM-HG verdünnt. Die Lipofektamin-Verdünnung wurde für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit den verdünnten Plasmidlösungen vorsichtig vermischt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit den Lipofektamin-Plasmid-Lösungen exponiert. Anschließend wurden die Zellen für vier Stunden in einem CO₂-Brutschrank (37 °C) inkubiert. Danach wurde die Lipofektamin-Plasmid-Lösung durch Wachstumsmedium (Quantum 263 mit Penicillin/Streptomycin) ersetzt und die Zellen weitere 43 Stunden kultiviert.

2.2.5 BCL6-Expressionsanalyse in Nierenkarzinomzelllinien

Um herauszufinden, ob die BCL6-Transfektion erfolgreich war, wurde untersucht, ob die Zelllinien BCL6 exprimieren. Dazu wurden die untersuchten Zellen, wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, entweder mit dem Expressionsvektor für BCL6 (pcDNA3-BCL6) oder mit dem Leervektor (pcDNA3) transfiziert. Im Anschluss wurde die RNA aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Danach wurde mittels der PCR-Analyse die Transfektion für jedes Experiment kontrolliert. Zusätzlich wurde mithilfe der Taqman® real-time PCR die Expression von SLC-Transportern quantifiziert.

2.2.5.1 Isolierung und Aufreinigung der RNA

Für die RNA-Isolierung aus den vier Nierenkarzinomzelllinien 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1 wurde das RNeasy® Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Das Prinzip dieses Kits basiert auf dem Lysieren und Homogenisieren der Zellproben und dem anschließenden Auffangen der einzelsträngigen RNA auf einer mit Silikon-Gel beschichteten Membran (Chomczynski und Sacchi 1987). Die RNA-Extraktion erfolgte 43 Stunden nach der Transfektion der Zellproben in Reaktionsgefäßen, die vom Hersteller geliefert wurden.

Die Isolation der RNA wurde für pcDNA3-transfizierte und BCL6-transfizierte Zellen parallel vorgenommen. Alle Schritte erfolgten, wenn nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur. RLT-Puffer aus dem Kit wurde mit β -Mercaptoethanol (β -ME) versetzt (Verhältnis: 10 μ l β -ME zu 1 ml RLT-Puffer), durch Vortexen vermischt und je 150 μ l dieses Gemisches/Well auf die Zellen pipettiert. Der RLT-Puffer besteht aus hochkonzentriertem Guanidinisothiocyanat. Dieses Salz lysiert Zellen, inaktiviert die RNasen und denaturiert Proteine. Zusätzlich wurden 150 μ l Ethanol (70 %) auf die Zellproben gegeben, um optimale Bedingungen für die Bindung an die Silikon-Gel-Membran zu schaffen. Dann wurde die mitgelieferte RNeasy Mini-Spinsäule auf einem 2-ml-Auffangröhrchen platziert und das Lysat auf die Säule überführt. Es folgte die Zentrifugation der Proben für 15 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit. Der Durchfluss wurde verworfen. Um reine RNA zu eluieren folgten drei Waschschriffe. Dazu wurden 700 μ l RW1-Waschpuffer und nach dem anschließenden Zentrifugieren für eine Minute zweimal jeweils 500 μ l PRE-Puffer auf die Säule gegeben und erneut zwei Minuten zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Die Auffangröhrchen wurden verworfen und die Säule auf ein steriles 1,5-ml-Eppendorfgefäß platziert. Im letzten Schritt wurde die gebundene RNA mit 30 μ l RNase-freiem Wasser von der Säulenmatrix eluiert. Die RNA wurde im Anschluss direkt auf Eis gelagert und die Konzentration photometrisch mithilfe des GeneQuant-Gerätes bestimmt. Die RNA wurde entweder direkt für die reverse Transkription verwendet oder bis zur weiteren Verarbeitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.5.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Gesamt-RNA stellt ein Gemisch aus Transfer-RNA (tRNA), ribosomaler RNA (rRNA) sowie *messenger* RNA (mRNA, Boten-RNA) dar. In dieser Arbeit wurde als Ausgangsmaterial für die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) die zur RNA komplementäre *complementary* DNA (cDNA) verwendet. Hierzu wurde die aufgereinigte Gesamt-RNA mithilfe des Enzyms reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die verwendete reverse Transkriptase Superscript®II (Invitrogen™, Life Technologies) ist eine spezielle RNA-abhängige DNA-Polymerase. Die einzelsträngige RNA dient der reversen Transkriptase als Matrize (Template) und wird in einzelsträngige komplementäre cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Synthese erfolgte in drei Schritten und nach Empfehlung des Herstellers. Dazu wurden im ersten Schritt je 2 μ g RNA zu 500 ng/ μ l Oligonukleotiden als Primer (Oligo-dT-Primer 5'-TTTTTTTTTTTT-3') und 10 mM dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate) hinzugefügt. Der Ansatz wurde auf je 13,5 μ l mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt. Die Proben wurden zur Denaturierung der RNA in ein Heizgerät (in dieser Arbeit als Thermocycler bezeichnet) gestellt und inkubiert.

Tabelle 2.13: Temperaturvorgaben Schritt 1: Denaturierung der RNA

| Zeit (Minuten) | Temperatur (°C) | Prozess |
|----------------|-----------------|--|
| 5 | 65 | Denaturierung der Sekundärstruktur der RNA |
| 5 | 4 | Abkühlen |

Im zweiten Schritt wurden zu jedem Ansatz je 6 µl Mastermix (Tab. 2.14) pipettiert und die Proben anschließend für zwei Minuten im Thermocycler inkubiert. Bei einer Temperatur von 42 °C lagerten sich die Oligo-dT-Primer an das 5'-Ende der mRNA an (Annealing).

Tabelle 2.14: Zusammensetzung des Mastermixes für die cDNA-Synthese

| Reagenz | Menge |
|----------------------------|-------|
| 5 x First-Strand Puffer | 4 µl |
| 0,1 M Dithiothreitol (DTT) | 2 µl |

Im letzten Schritt wurde jeder Ansatz mit 0,5 µl Superscript®II versetzt, durch Pipettieren sorgfältig vermischt und die reverse Transkription durchgeführt.

Tabelle 2.15: cDNA-Synthese mit Superscript®II

| Zeit (Minuten) | Temperatur (°C) | Prozess |
|----------------|-----------------|--------------------------|
| 50 | 42 | cDNA-Synthese |
| 15 | 70 | Inaktivierung des Enzyms |

Die synthetisierte cDNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C tiefgefroren.

2.2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR erlaubt die enzymatische Amplifikation, also die Vervielfältigung bestimmter Nukleotidsequenzen. Das Prinzip dieser Methode ist die zyklische Wiederholung der jeweiligen Reaktionsschritte, bei der die Produkte der vorangegangenen Zyklen die Ausgangsprodukte für den nächsten Reaktionszyklus darstellen. Die neu gebildeten DNA-Stränge dienen in den folgenden Zyklen demnach wieder als Matrizen. Auf diese Weise wird der Matrizenstrang exponentiell amplifiziert. Für die in diesen Experimenten angewandte PCR-Analyse wurden neben dem zu vervielfältigendem DNA-Abschnitt (Template) die aus dem hitzestabilen Bakterienstamm *Thermus aquaticus* isolierte DNA-Polymerase (Taq-Polymerase), zwei spezifische, einzelsträngige Oligonukleotide (Primer) sowie dNTPs benötigt.

Ein typischer PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten:

1. Denaturierung
2. Annealing (= Hybridisierung der Primer)
3. Elongation: Amplifikation des DNA-Abschnitts in 5'→3' – Richtung

Während des Denaturierungsschrittes wird der zu amplifizierende DNA-Doppelstrang durch Erhitzen in zwei Einzelstränge getrennt. Beim Annealing-Schritt ermöglicht das Abkühlen die Hybridisierung der im Überschuss zugegebenen spezifischen Oligonukleotidprimer mit dem gewünschten Genabschnitt der komplementären DNA-Matrize. Im letzten Schritt erfolgt die eigentliche DNA-Synthese. Dazu wird die Temperatur auf das Temperaturoptimum der spezifischen DNA-Polymerase erhöht, wodurch beide Primer in 5'→3' – Richtung elongiert werden. Dieser Zyklus wird 20 bis 30 Mal wiederholt, was einem Amplifikationsfaktor von 10^6 bzw. 10^7 entspricht.

2.2.5.3.1 PCR-Analyse

Die Polymerase-Kettenreaktion diente in der vorliegenden Arbeit der Qualitätskontrolle der reversen Transkription. In einem 0,5-ml-Eppendorfgefäß wurden 48 µl Mastermix angesetzt (siehe Tab. 2.16). Der Mastermix wurde mit 2 µl cDNA versetzt. Für die Negativkontrolle wurde die cDNA durch Wasser ersetzt. Der Mastermix wurde mit der cDNA-Probe vermischt und anschließend die PCR im Thermocycler nach dem Schema der Tab. 2.17 durchgeführt.

Tabelle 2.16: Mastermix-Zusammensetzung für die Standard-PCR

| Reagenz | Volumen |
|--------------------------|---------|
| PCR-Puffer (10 x) | 5 µl |
| Forward Primer (20pmol) | 1 µl |
| Reverse Primer (20 pmol) | 1 µl |
| dNTPs (jeweils 1,25 mM) | 3 µl |
| Taq-Polymerase | 2 µl |
| H ₂ O | 31 µl |

Tabelle 2.17: Thermocycler-Programm für die Standard-PCR

| Zyklenzahl | Temperatur (°C) | Zeit | Schritt |
|------------|-----------------|--------|------------------------|
| 1 | 94 | 2 min | initiale Denaturierung |
| 22 | 94 | 40 sek | Denaturierung |
| | 56 | 50 sek | Annealing |
| 1 | 72 | 50 sek | Elongation |
| | 72 | 10 min | finale Elongation |

2.2.5.4 Agarosegel-Elektrophorese

Die Methode der Gelelektrophorese ist ein Trennverfahren, um DNA-Fragmente abhängig von ihrer Größe aufzutrennen und zu identifizieren (Mülhardt 2009). Dabei wird Agarosegel als Trägermedium verwendet, welches eine Art Siebstruktur aufweist.

Die negativ geladene DNA wird auf das Gel gegeben und anschließend wird ein elektrisches Feld angelegt. Innerhalb des elektrischen Feldes bewegen sich die DNA-Fragmente von der negativ geladenen Kathode je nach Größe und Ladung der Moleküle mit unterschiedlicher Geschwindigkeit zur positiv geladenen Anode. Da die Poren des Agarosegels für kleinere Fragmente weniger Widerstand darstellen, durchlaufen kurze DNA-Fragmente das Agarosegel schneller als längere Fragmente. Zur Überprüfung des 572 bp-PCR-Produktes (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, GAPDH) wurde ein 1,5 %iges Agarosegel hergestellt, zur Überprüfung des 91-bp-PCR-Produktes (BCL6) ein 2 %iges Agarosegel. Agarose wurde dafür in 0,5 x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer) gelöst und in der Mikrowelle erhitzt. Um die DNA im Gel sichtbar zu machen wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben. Das auspolymerisierte Agarosegel wurde in eine mit Elektrophoresepuffer (0,5 x TBE) gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die DNA-Fragmente wurden mit DNA Stopp vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Dann wurde eine Spannung von 110 V angelegt und für 40-60 Minuten aufrechterhalten. Danach wurde das Ergebnis unter UV-Licht betrachtet und fotografiert.

2.2.5.5 Quantitative TaqMan® real-time PCR

Die quantitative real-time PCR ermöglicht die semi-quantitative Bestimmung der mRNA-Expressionsspiegel. Diese Methode wird auch Echtzeit-PCR genannt, da im Gegensatz zur Standard-PCR die Detektion bereits während der Amplifikation stattfindet. Bei jedem real-time PCR-Zyklus wird das gewünschte Transkript verdoppelt. In dieser Arbeit wurde die real-time PCR nach dem TaqMan-Prinzip mit TaqMan®-Gene expression Assays (in dieser Arbeit als TaqMan®-Primer bezeichnet) durchgeführt. TaqMan®-Primer sind Oligonukleotide, welche sequenzspezifisch an komplementäre cDNA-Sequenzen binden und an die zwei Fluoreszenzfarbstoffe gebunden sind. Die Fluoreszenzfarbstoffe emittieren in Gegenwart einer Lichtquelle Licht. Das 5'-Ende der Sonden ist mit dem Reporterfarbstoff 6-FAM™ (6-Carboxy-Fluorescein) belegt, das 3'-Ende mit dem Quencherfarbstoff TAMRA™ (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin). Die Methode macht sich den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zunutze. Die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes wird durch den Quencherfarbstoff unterdrückt. Die TaqMan®-Primer binden während der real-time PCR an die DNA. Trifft die Taq-Polymerase während der Extensionsphase auf die spezifisch gebundene TaqMan-Sonde, so hydrolysiert die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase die Sonde und trennt dabei den Reporter- vom Quencherfarbstoff. Daraus resultiert, dass die

Fluoreszenzfarbstoffe des Reporters freigesetzt werden und Fluoreszenz emittieren. Die Lichtstärke korreliert mit der Menge freigesetzter Fluoreszenzfarbstoffe und demnach mit der Menge der vervielfältigten DNA. Die Messung der Fluoreszenz findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt. Ein Zyklus der TaqMan® real-time PCR besteht aus folgenden Schritten:

- Denaturierung
- Annealing (= Hybridisierung der Primer)
- Elongation des zweiten DNA-Stranges mittels der Taq-Polymerase

Die eingesetzte Taq-Polymerase hat eine Synthese- und eine Exonukleaseaktivität. Der Reaktionsansatz der TaqMan® real-time PCR setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 2.18: Reaktionsansatz der TaqMan® real-time PCR

| Reagenz | Volumen |
|---|---------|
| Reaktionspuffer (TaqMan®-Mastermix) (2 x) | 10 µl |
| TaqMan-Primer (20 x) | 1 µl |
| cDNA-Probe | 1 µl |
| H ₂ O | 8 µl |

Pro Experiment wurden jeweils zwei Proben eines Transporters untersucht. Zusätzlich zu den zu untersuchenden Proben wurden pro Zelllinie auch jeweils zwei Proben des Referenzgens GAPDH sowie des Gens BCL6 untersucht. Die hergestellten Reaktionsansätze wurden in den real-time PCR-Thermocycler überführt und die real-time PCR bei dem in Tab. 2.19 angegebenen Temperatur-Zeit-Profil durchgeführt.

Tabelle 2.19: Bedingungen der TaqMan® real-time PCR

| Temperatur (°C) | Zeit | Zyklusanzahl |
|-----------------|--------|--------------|
| 50 | 2 min | 1 |
| 95 | 10 min | 1 |
| 95 | 15 sek | 40 |
| 60 | 1 min | 40 |

Als Maß für die Quantifizierung der mRNA der untersuchten Gene ist der CT-Wert (*cycle of threshold*) von Bedeutung. Der CT-Wert entspricht der Anzahl von PCR-Zyklen die mindestens nötig sind, um ein konstantes Fluoreszenzniveau zu erreichen, welches sich vom Hintergrundrauschen unterscheidet (Pfaffl 2004). Niedrig exprimierte Gene benötigen mehr Zyklen zum Erreichen des CT-Wertes als höher exprimierte Gene. Die Auswertung der real-time PCR basiert auf der Δ CT Methode (Δ CT = CT Zielgen – CT Referenzgen GAPDH).

Dabei wird für jede untersuchte Probe der CT-Wert eines eingesetzten Referenzgens („Haushaltsgen“, *housekeeping gene*) vom CT-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Von diesem Gen kann eine konstante Expressionsmenge in allen untersuchten Proben vorausgesetzt werden.

2.2.5.6 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die 24-Well-Platten mit je einem Glasplättchen/Well belegt und mit Poly-D-Lysin beschichtet. Anschließend wurden die Zellen im Wachstumsmedium ohne Antibiotika kultiviert. Danach wurden die Zellen entweder mit dem Kontrollvektor pcDNA3 oder mit dem Expressionsvektor pcDNA3-BCL6 transfiziert. Die Transfektion wurde, wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, durchgeführt. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml PBS/Well gewaschen und anschließend für acht Minuten bei Raumtemperatur mit je 1 ml 3,7 %iger Formaldehyd-Lösung (in PBS) pro Well fixiert. Danach wurden die Zellen erneut zweimal mit je 1 ml PBS/Well gewaschen. Alle weiteren Schritte erfolgten ebenfalls bei Raumtemperatur. Nach der Fixierung wurden die Zellen für fünf Minuten mit je 1 ml/Well Permeabilisierungslösung (50 mM Na₂HPO₄ (pH 7,4); 0,5 mM NaCl und 0,3 % Triton X-100) permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal mit je 1 ml PBS/Well gewaschen. Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden im Anschluss mit Antikörpern und dem Fluoreszenzfarbstoff, jeweils mit PBS und 0,1 % bovinem Serumalbumin (BSA) verdünnt, inkubiert. Im ersten Schritt wurden die Zellen mit 150 µl/Well von 1 µg/ml Primärantikörper *monoclonal-mouse-anti-BCL6* (Santa Cruz) für zwei Stunden bei Raumtemperatur und unter Schütteln bei ca. 250 Upm inkubiert. Nach der Inkubation erfolgten drei Waschschrte mit je 500 µl PBS/Well für jeweils 15 Minuten. Im Anschluss wurden die Zellen mit 150 µl der 1 %igen PBS-BSA-Lösung/Well für 15 Minuten inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Dann wurde der verdünnte Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 *goat anti-mouse* IgG (H+L) (Invitrogen™ Life Technologies) in die Wells gegeben und die Zellen eine Stunde abgedunkelt inkubiert. Nach einer Stunde folgten drei Waschschrte mit je 500 µl PBS/Well für jeweils 15 Minuten. Die letzte Anfärbung erfolgte durch Inkubation der Zellen mit je 300 µl von 300 nM des Fluoreszenzfarbstoffs 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, Invitrogen™ Life Technologies) für drei Minuten im Dunkeln. Abschließend wurden die Zellen dreimal mit je 500 µl PBS 15 Minuten gewaschen, bevor sie auf Objektträgern fixiert wurden. Die mikroskopische Analyse erfolgte mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axio Observer D1, Carl Zeiss AG). BCL6 wurde mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, DAPI bei 365 nm. Als Immersionsflüssigkeit diente Immersol™ 518 F (Carl Zeiss AG). Die Auswertung der Transfektionseffizienz erfolgte unter 200-facher Vergrößerung. Mit dem Programm ImageJ 1.44 wurden die mit DAPI angefärbten

(blauen) Zellkerne gezählt und als 100 % gesetzt. Dann wurden die mit BCL6-transfizierten angefärbten (grünen) Zellkerne ermittelt und diese Anzahl im Verhältnis zu den blau angefärbten Zellkernen bestimmt:

$$\frac{\text{BCL6 – positive Zellkerne} \times 100}{\text{DAPI – positive Zellkerne}}$$

2.2.6 Untersuchung der Caspase-3-Aktivität

Zu den morphologischen Merkmalen des programmierten Zelltodes gehören die Schrumpfung der Zellen, die nukleäre Fragmentierung, die Chromatin-Kondensation, die DNA-Fragmentierung und der Zerfall der Plasmamembran. Zu den wichtigsten Enzymen der Apoptose gehören Caspasen. Dabei handelt es sich um aspartatspezifische Cysteinproteasen. Diese Cysteinyl-Aspartasen spalten die Peptidbindungen C-terminal vom Aspartat ab. Initiatorcaspasen wie z.B. die Caspase 2 und 8 initiieren die Apoptose und aktivieren die Caspase 3 und 7. Aktivierte Caspase 3 dient als Nachweis für die induzierte Apoptose. Dieser Nachweis wurde in den durchgeführten Experimenten mit dem EnzChek® Caspase-3 Assay Kit #2 (Molecular Probes) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen 48 Stunden nach der Transfektion mit unterschiedlichen Konzentrationen von 5-Fluorouracil, Irinotecan und Oxaliplatin für 16 Stunden inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 500 µl PBS/Well gewaschen, mit 200 µl Trypsin/Well abgelöst und anschließend zentrifugiert (drei Minuten, 300 x g, Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen sofort bei -80 °C eingefroren. Zur Analyse der Caspaseaktivität wurden die Zellen abgetaut und mit je 70 µl Lysepuffer inkubiert. Zur optimalen Lyse wurden die Zellen dreimal im flüssigen Stickstoff eingefroren und abgetaut und anschließend fünf Minuten zentrifugiert. Das weitere Vorgehen erfolgte nach Herstellerangaben. Mithilfe der Software Microwin 2000 Version 4.41 wurde die Fluoreszenz im Mikroplattenleser Mithras LB 940 ermittelt. Im Anschluss erfolgte die Quantifizierung der Proteinkonzentration nach Bradford (siehe Kapitel 2.2.7). Die ermittelte Fluoreszenz wurde zum Gesamtproteingehalt in Verhältnis gesetzt.

2.2.7 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde mithilfe der Methode nach Bradford ermittelt (Bradford, 1976). Die Methode ermöglicht die gleichmäßige Aufladung von Proteinmengen einer Probe. Das Verfahren basiert auf der Komplexbildung des Triphenylmethan-Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau mit Proteinen. Durch diese Reaktion entsteht ein anionischer, blauer Farbstoff und eine daraus folgende Veränderung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 495 nm in der ungebundenen Form zu 595 nm in der gebundenen Form. In die Wells einer 96-Well-Platte wurden je 5 µl der zu untersuchenden Probe pipettiert und im Verhältnis 1:5

mit PBS verdünnt. Jede Probenlösung wurde mit je 200 µl Bradfordlösung gemischt, welche zuvor im Verhältnis 1:4 mit destilliertem Wasser verdünnt wurde. Zur Kalibrierung wurde eine Standardkurve mit den folgenden aufsteigenden Konzentrationen von bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS erstellt: 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml. Die Standardlösung wurde ebenso mit 200 µl der Bradfordlösung vermischt. Nach zehn Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption photometrisch bei 595 nm im Mikroplattenleser mit der Software Microwin 2000 Version 4.41 gemessen. Für die Probenlösung und die Standardlösung wurden Doppelbestimmungen gemessen.

2.2.8 Statistische Auswertungen

Die statistische Analyse der real-time PCR-Daten und der Ergebnisse aus dem Apoptose Assay erfolgte mittels der GraphPad Prism-Software (Version 4).

Die Messdaten sind Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) aus vier bis fünf unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse der gemessenen Werte erfolgte für den Vergleich von zwei unabhängigen Proben durch den zweiseitigen ungepaarten t-Test (*unpaired* t-Test). Um signifikante Unterschiede zwischen mehreren Versuchsgruppen und einer Kontrollgruppe zu überprüfen, wurden die Daten mittels *one-way* ANOVA mit dem Dunnett's *multiple comparison*-Test analysiert.

3. Ergebnisse

3.1. Zellmorphologie und -wachstum

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Zelllinien 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1 zeigen deutliche Unterschiede in der Morphologie (Abb. 3.1 A-D). Die Zellen der Karzinomzelllinie 786-O wachsen spindelförmig mit zum Teil langen Ausläufern, die Zellen der Zelllinien ACHN, LN78 sowie RCCNG1 eher polygonal mit rundem Zellkörper. Die Zelllinie RCCNG1 zeigt zum Teil lange Ausläufer, bevor sie die 100 %ige Zelldichte erreicht. Die Zellen der Zelllinien ACHN und LN78 sind kleiner als die Zellen der Zelllinien 786-O und RCCNG1. Während die Zellen der Zelllinie 786-O eher in lockeren Zellverbänden wachsen, weisen die Zellen der Nierenkarzinomzelllinien ACHN, LN78 und RCCNG1 ein dichteres Zellwachstum auf.

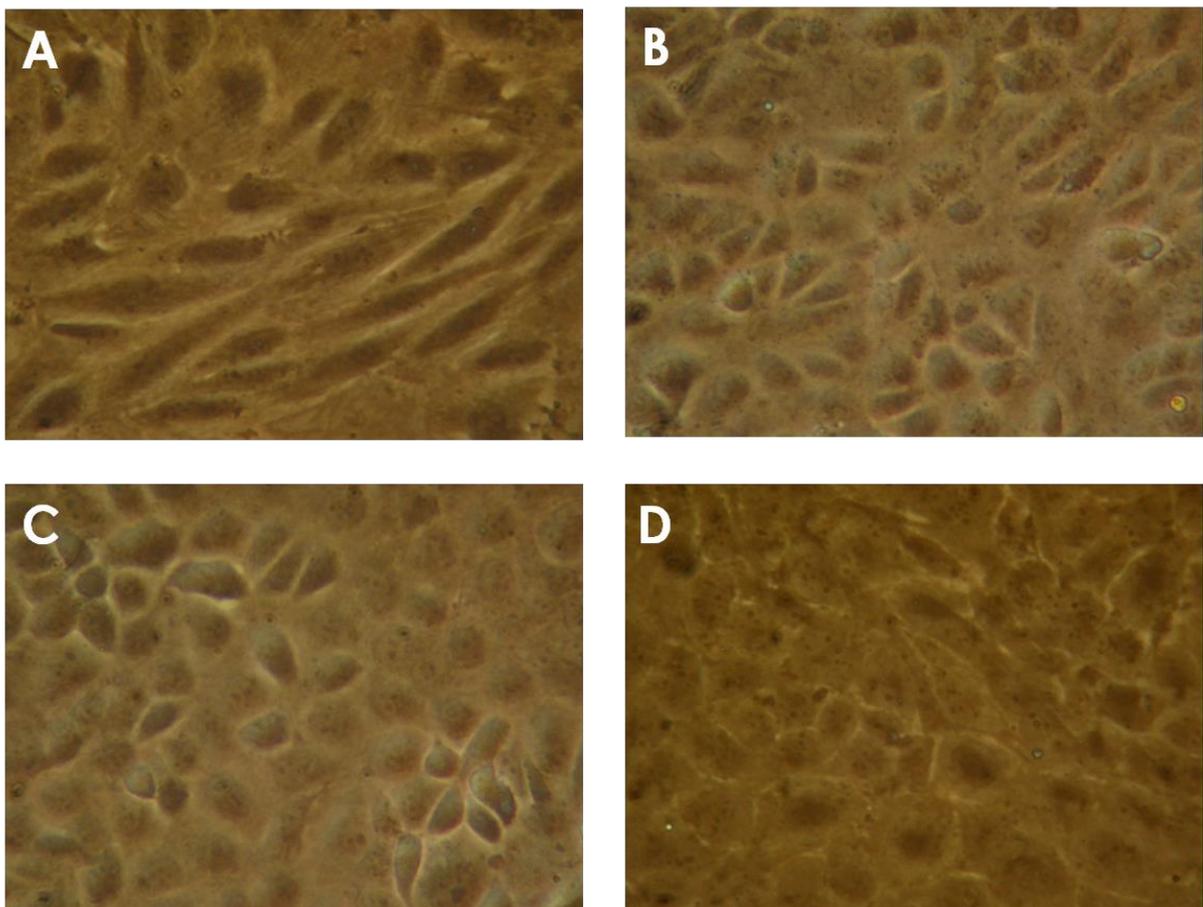


Abbildung 3.1: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zelllinien (A) 786-O, (B) ACHN, (C) LN78, (D) RCCNG1.

Die Nierenkarzinomzelllinien wurden im Zellkulturmedium Quantum 263 mit Penicillin/Streptomycin ausgesät und in einem CO₂-Brutschrank bei 37 °C kultiviert. 100-fache Vergrößerung.

3.2. Nachweis des BCL6-Gens in Nierenkarzinomzelllinien

Die Zelllinien 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1 wurden entweder mit dem Expressionsvektor für BCL6 (pcDNA3-BCL6) oder mit dem Leervektor (pcDNA3) transfiziert. Anschließend wurde die RNA aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mithilfe einer PCR-Analyse wurde die Transfektion für jedes Experiment kontrolliert. Die Höhe der Banden an der DNA-Leiter trifft auf die errechneten Größen der angewandten Primer von 572 Basenpaaren (bp) für das verwendete Haushaltsgen GAPDH und 91 bp für das BCL6-Gen zu. Für jede Zelllinie wurde das Experiment fünfmal in unabhängigen Versuchen durchgeführt. Das bedeutet, dass die Experimente mit Nierenkarzinomzelllinien in verschiedenen Zell-Passagen durchgeführt wurden.

3.2.1. Nachweis des BCL6-Gens in der Zelllinie 786-O

Nach der Transfektion mit pcDNA3-BCL6 wurde das BCL6-Gen in der Zelllinie 786-O erfolgreich überexprimiert (siehe Abb. 3.2). BCL6 wurde in dieser Zelllinie auch endogen exprimiert, wenngleich die Bande für die pcDNA3-transfizierten Kontrollzellen nur schwach detektiert wurde.

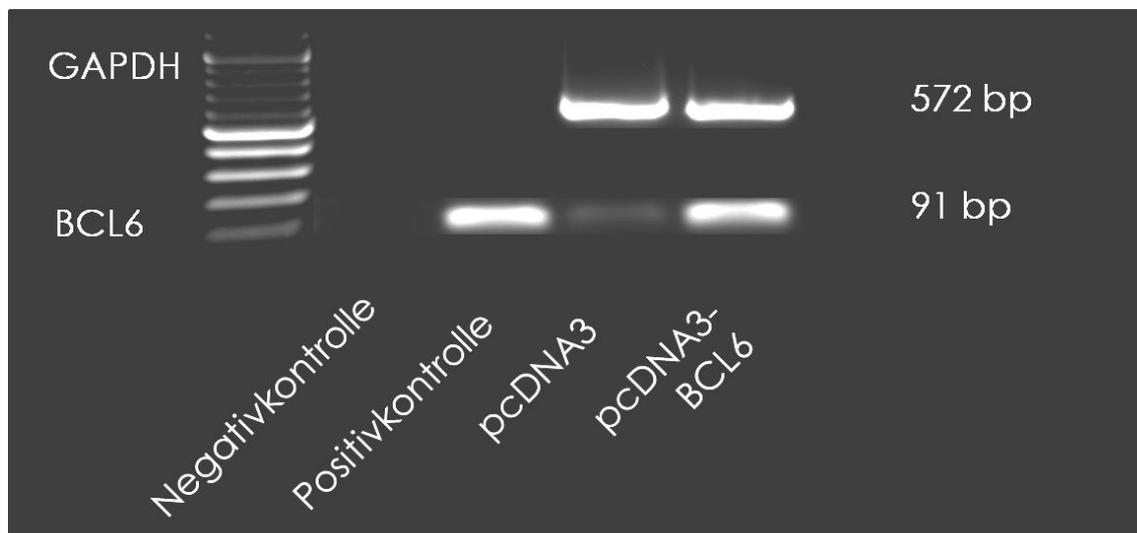


Abbildung 3.2: **Nachweis des BCL6-Gens in der Zelllinie 786-O.**

Die einzelnen PCR-Produkte wurden mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt und mithilfe von Ethidiumbromid detektiert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment aus einer Serie von fünf unabhängigen Versuchen. Negativkontrolle = Leerwert (H₂O); Positivkontrolle = BCL6-Plasmid; pcDNA3 = mit Leervektor transfizierte Zellen; pcDNA3-BCL6 = mit BCL6-Expressionsplasmid transfizierte Zellen.

3.2.2. Nachweis des BCL6-Gens in der Zelllinie ACHN

Das Expressionsplasmid pcDNA3-BCL6 wurde, wie in Abb. 3.3 dargestellt, in der Zelllinie ACHN erfolgreich transfiziert. Die Abbildung zeigt, dass ACHN-Zellen BCL6 auch endogen exprimieren.

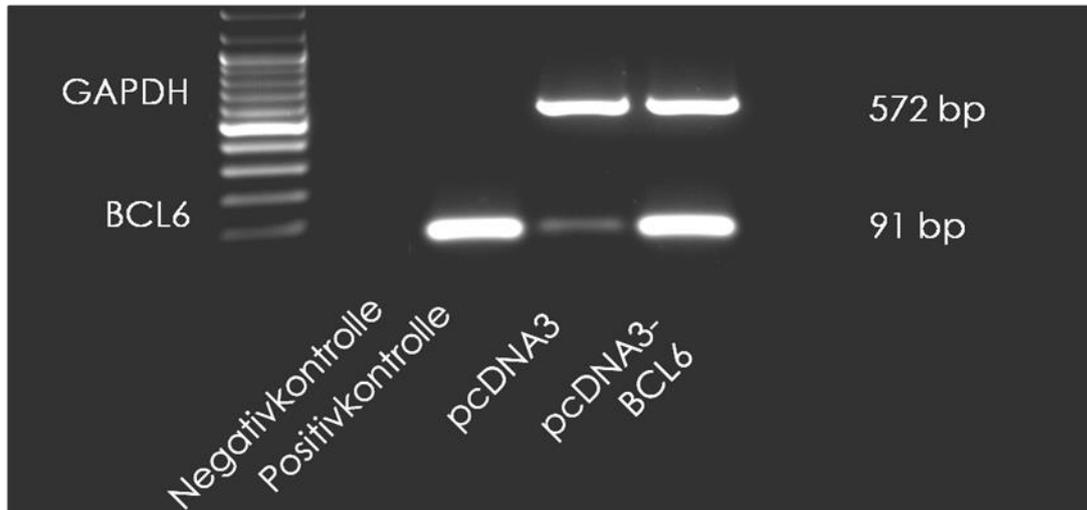


Abbildung 3.3: Nachweis des BCL6-Gens in der Zelllinie ACHN.

Die einzelnen PCR-Produkte wurden mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt und mithilfe von Ethidiumbromid detektiert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment aus einer Serie von fünf unabhängigen Versuchen. Negativkontrolle = Leerwert (H₂O); Positivkontrolle = BCL6-Plasmid; pcDNA3 = mit Leervektor transfizierte Zellen; pcDNA3-BCL6 = mit BCL6-Expressionsplasmid transfizierte Zellen.

3.2.3. Nachweis des BCL6-Gens in der Zelllinie LN78

Wie die Abb. 3.4 zeigt, ist das BCL6-Gen nach der Transfektion in der Nierenkarzinomzelllinie LN78 nachweisbar. Die endogene BCL6-Expression konnte auch in dieser Nierenkarzinomzelllinie nachgewiesen werden.

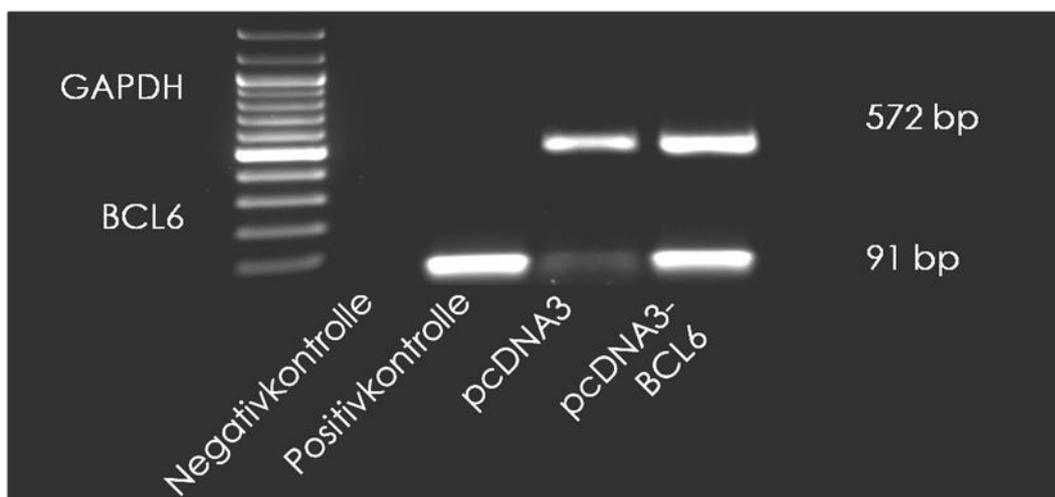


Abbildung 3.4: Nachweis des BCL6-Gens in der Zelllinie LN78.

Die einzelnen PCR-Produkte wurden mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt und mithilfe von Ethidiumbromid detektiert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment aus einer Serie von fünf unabhängigen Versuchen. Negativkontrolle = Leerwert (H₂O); Positivkontrolle = BCL6-Plasmid; pcDNA3 = mit Leervektor transfizierte Zellen; pcDNA3-BCL6 = mit BCL6-Expressionsplasmid transfizierte Zellen.

3.2.4. Nachweis des BCL6-Gens in der Zelllinie RCCNG1

Durch die Transfektion mit dem Transkriptionsfaktor pcDNA3-BCL6 wurde BCL6 in der Zelllinie RCCNG1 überexprimiert (siehe Abb. 3.5). Eine endogene BCL6-Expression wurde auch in den RCCNG1-Zellen nachgewiesen.

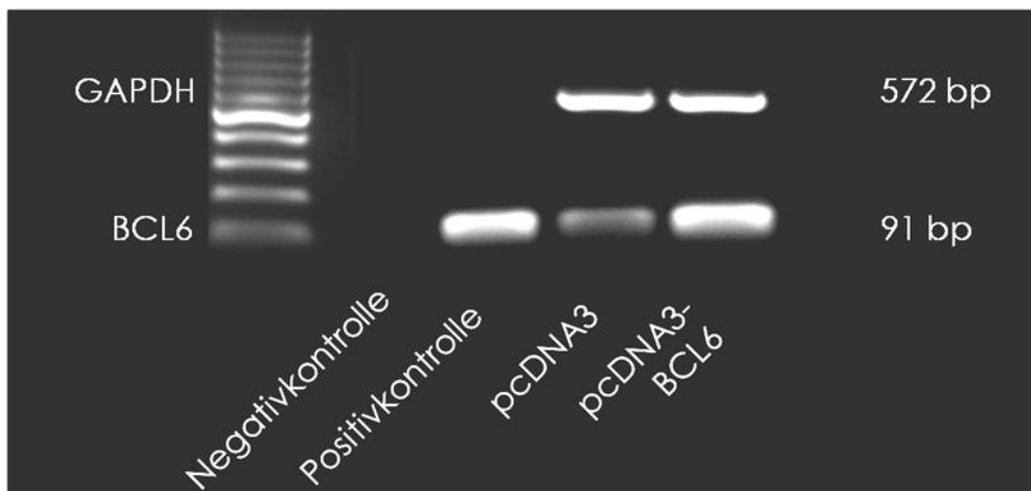


Abbildung 3.5: **Nachweis des BCL6-Gens in der Zelllinie RCCNG1.**

Die einzelnen PCR-Produkte wurden mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt und mithilfe von Ethidiumbromid detektiert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment aus einer Serie von fünf unabhängigen Versuchen. Negativkontrolle = Leerwert (H₂O); Positivkontrolle = BCL6-Plasmid; pcDNA3 = mit Leervektor transfizierte Zellen; pcDNA3-BCL6 = mit BCL6-Expressionsplasmid transfizierte Zellen.

3.3. Expression von SLC-Transportern und ABC-Transportern in Nierenkarzinomzelllinien

In den Nierenkarzinomzelllinien 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1 wurde mittels quantitativer real-time PCR die mRNA-Expression der Transportproteine untersucht. Die überprüften Proben der Abbildungen 3.2 - 3.5 wurden als Ausgangsmaterial für die real-time PCR-Analyse eingesetzt. Jede Probe wurde in der real-time PCR-Analyse doppelt bestimmt. Aus den einzelnen Amplifikationskurven wurden mithilfe der Software MxPro CT-Werte errechnet. Die Intravarianz der einzelnen CT-Werte lag stets unter 5 %. Der CT-Wert gibt jeweils die Zyklenanzahl der PCR an, welche erforderlich ist, damit ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann. Das bedeutet, je niedriger ein Gen exprimiert ist, umso mehr PCR-Zyklen sind erforderlich, um das Gen zu detektieren. Der Δ CT-Wert gibt die Differenz zwischen dem untersuchten Gen und dem Haushaltsgen GAPDH an. Für die real-time PCR

wurden ausschließlich TaqMan®-Primer verwendet, die spezifisch an die mRNA der untersuchten Gene binden.

3.3.1. GAPDH-Expression unter Einfluss der BCL6-Überexpression

Zur Kontrolle, ob das Haushaltsgen GAPDH tatsächlich konstant in allen Zellen exprimiert und durch die Transfektion der Zellen mit pcDNA3-BCL6 nicht beeinflusst wurde, diente das folgende Experiment. Dabei wurden aus jeder real-time PCR-Analyse die CT-Werte des Haushaltsgens zwischen BCL6- und Leervektor-transfizierten Zellen verglichen. Wie die Abbildung 3.6 zeigt, änderte sich GAPDH unter BCL6-Transfektion nicht signifikant. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen pcDNA3-transfizierten Zellen (graue Balken) und pcDNA3-BCL6-transfizierten Zellen (schwarze Balken) nachweisbar. Demzufolge konnte man die GAPDH-Expression für die nachfolgenden Experimente als konstant betrachten.

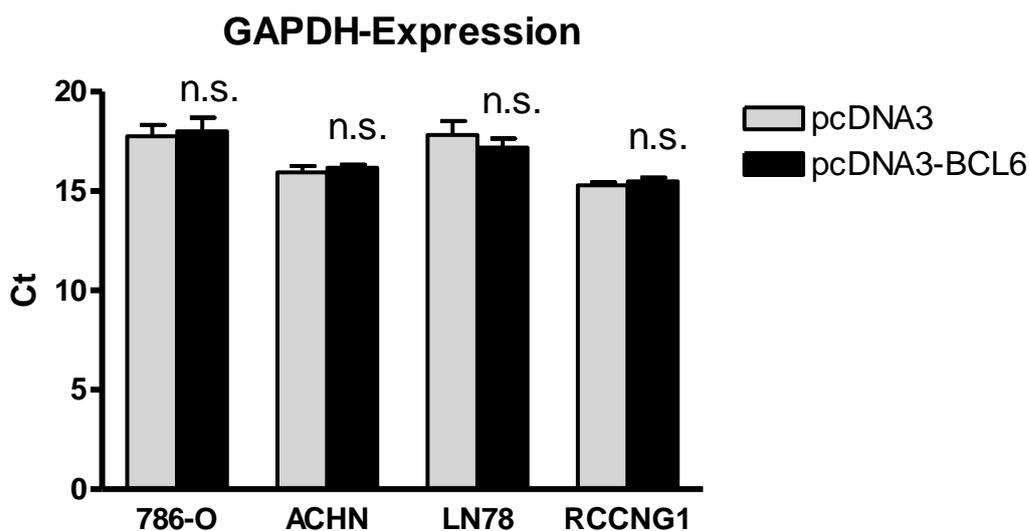


Abbildung 3.6: GAPDH-Expression in den Zelllinien 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1 unter Einfluss der BCL6-Überexpression.

Die Zelllinien 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1 wurden entweder mit pcDNA3-BCL6 oder mit dem Kontrollvektor pcDNA3 transfiziert. Die Daten wurden dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M.; n=4. Statistische Analyse durch *unpaired* t-Test. n.s. = nicht signifikant.

In den folgenden Säulendiagrammen (Abb. 3.7 - 3.10) wird die Genexpression der unterschiedlich transfizierten Zellen verglichen. Die Ergebnisse der real-time PCR-Analyse von OATs, OCTs und von ausgewählten ABC-Transportern (MDR1 und MRP2) in den Zelllinien 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1 werden im Folgenden einzeln dargestellt.

3.3.2. OATs und OCT1 in 786-O

Die real-time PCR zeigte, dass durch die Transfektion der Zellen der Nierenkarzinomzelllinie 786-O mit dem Expressionsplasmid pcDNA3-BCL6 die Expression von BCL6 in der Zelllinie 786-O signifikant erhöht wurde (Abb. 3.7). Die Transporter OAT4, OAT10 und OCT1 wurden in der Zelllinie 786-O nachgewiesen. Die mRNA-Spiegel von OAT4, OAT10 und OCT1 wurden in der Nierenkarzinomzelllinie 786-O durch die BCL6-Überexpression nicht beeinflusst. OAT1 und OAT3 wurden ebenso untersucht, waren jedoch in keinem Versuch zu detektieren.

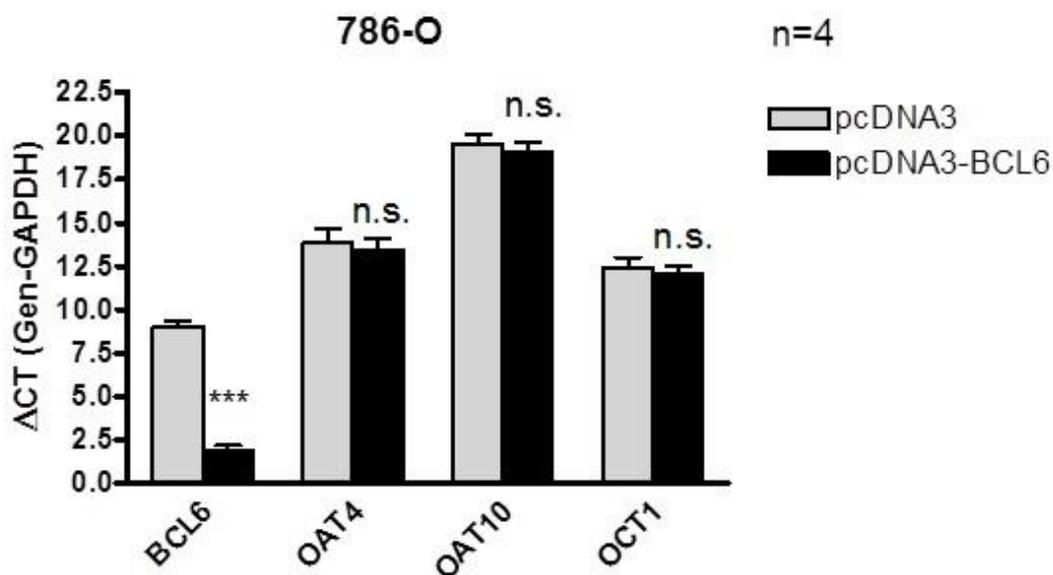


Abbildung 3.7: **Beeinflussung der Expression von OATs und OCT1 durch BCL6-Überexpression in der Nierenkarzinomzelllinie 786-O.**

Die Zellen wurden entweder mit dem Leervektor pcDNA3 (graue Balken) oder mit dem Expressionsplasmid pcDNA3-BCL6 (schwarze Balken) transfiziert. Die Daten wurden dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M.; n=4. Statistische Analyse durch *unpaired* t-Test: *** = $p < 0,001$, * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant. Δ CT = Differenz zwischen dem untersuchten Gen und dem Haushaltsgen (GAPDH).

3.3.3. OATs und OCT1 in ACHN

Die Expressionsrate des BCL6-Gens wurde durch die Transfektion der Zellen mit dem BCL6-Expressionsplasmid signifikant erhöht. Die Transporter OAT1, OAT3 und OAT4 waren in dieser Zelllinie nicht nachweisbar. OAT10 war in ACHN sehr niedrig exprimiert und es wurde kein Unterschied zwischen BCL6-transfizierten Zellen und Kontrollzellen nachgewiesen. Der Vergleich der Δ CT-Werte zeigte einen signifikanten Einfluss von BCL6 auf OCT1-mRNA. Die OCT1-mRNA wurde nach der Transfektion der Zellen mit BCL6 statistisch signifikant supprimiert. Die OCT1-mRNA wurde in BCL6-transfizierten Zellen durchschnittlich bei Zyklus

35 detektiert. Da die Differenz zu den Leervektor-transfizierten Zellen relativ gering war, wurde der Transporter OCT1 (SLC22A1) nicht weiter untersucht.

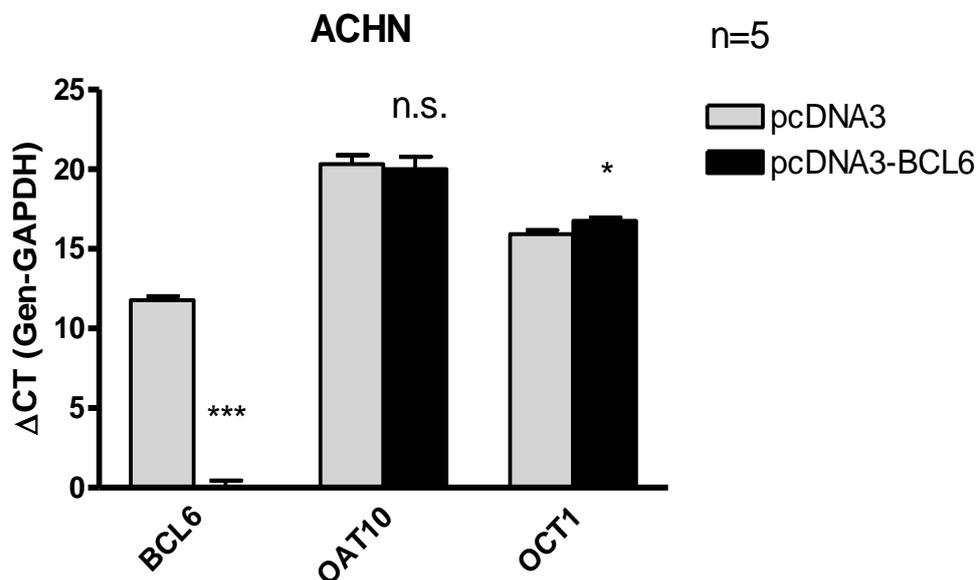


Abbildung 3.8: Beeinflussung der Expression von OAT10 und OCT1 durch BCL6-Überexpression in der Nierenkarzinomzelllinie ACHN.

Die Zellen wurden entweder mit dem Leervektor pcDNA3 (graue Balken) oder mit dem Expressionsplasmid pcDNA3-BCL6 (schwarze Balken) transfiziert. Die Daten wurden dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M.; n=5. Statistische Analyse durch *unpaired* t-Test: *** = $p < 0,001$, * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant. Δ CT = Differenz zwischen dem untersuchten Gen und dem Haushaltsgen (GAPDH).

3.3.4. OATs und OCT1 in LN78

In den Zellen der Karzinomzelllinie LN78 wurde nachgewiesen, dass BCL6-mRNA in BCL6-transfizierten Zellen im Vergleich zu Kontrollvektor-transfizierten Zellen signifikant erhöht wird (Abb. 3.9). Die mRNA von OAT1, OAT3 und OAT4 wurde in LN78-Zellen nicht exprimiert. Die Transporter OAT10 und OCT1 wurden in dieser Zelllinie nachgewiesen. Der Vergleich von pcDNA3- und BCL6-transfizierten Zellen zeigte in dieser Zelllinie für OAT10 und OCT1 keine signifikanten Unterschiede.

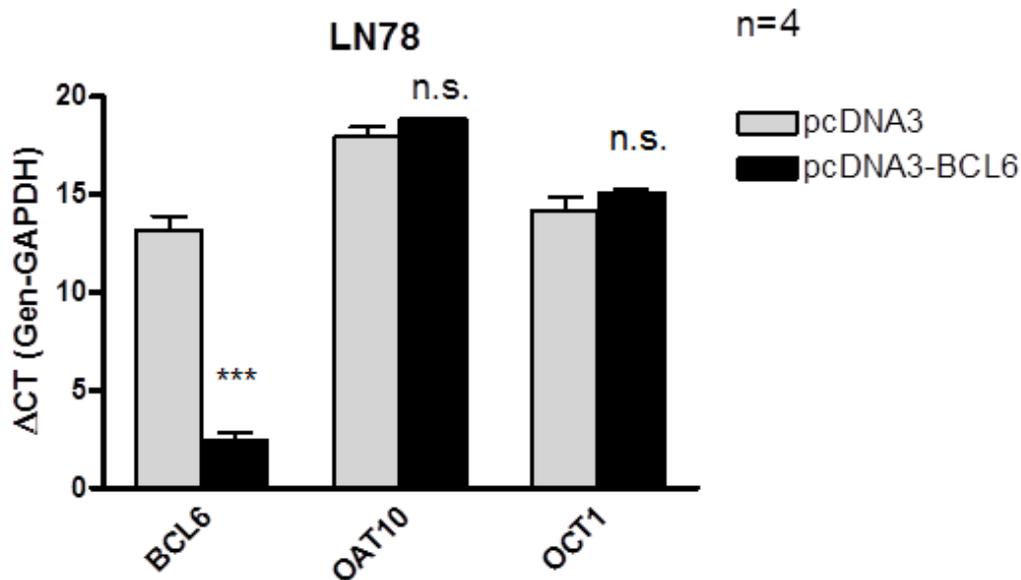


Abbildung 3.9: **Beeinflussung der Expression von OATs und OCT1 durch BCL6-Überexpression in der Nierenkarzinomzelllinie LN78.**

Die Zellen wurden entweder mit dem Leervektor pcDNA3 (graue Balken) oder mit dem Expressionsplasmid pcDNA3-BCL6 (schwarze Balken) transfiziert. Die Daten wurden dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M.; n=4. Statistische Analyse durch *unpaired* t-Test: *** = $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant. Δ CT = Differenz zwischen dem untersuchten Gen und dem Haushaltsgen (GAPDH).

3.3.5. OATs, OCTs, MRP2 und MDR1 in RCCNG1

Der mRNA-Spiegel von BCL6 wurde durch die Transfektion mit dem Expressionsplasmid pcDNA3-BCL6 in der Zelllinie RCCNG1 erhöht. RCCNG1-Zellen exprimieren nicht die Transportproteine OAT1, OAT3 und OCT3. Das Transportprotein OCT1 wurde nicht durch die BCL6-Überexpression beeinflusst. In dieser Zelllinie wurden zusätzlich zwei Mitglieder aus der Gen-Familie der ABC-Transporter, MRP2 und MDR1 untersucht. Die beiden ABC-Transporter wurden in der Zelllinie RCCNG1 zwar exprimiert, aber durch die BCL6-Transfektion nicht beeinflusst. Nach durchschnittlich 29,7 Zyklen wurde MRP2-mRNA detektiert. Bei dem Transportprotein MDR1 waren im Durchschnitt 37 PCR-Zyklen erforderlich, damit ein Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte. MRP2 wurde in RCCNG1-Zellen demnach höher exprimiert als der Efflux-Transporter MDR1.

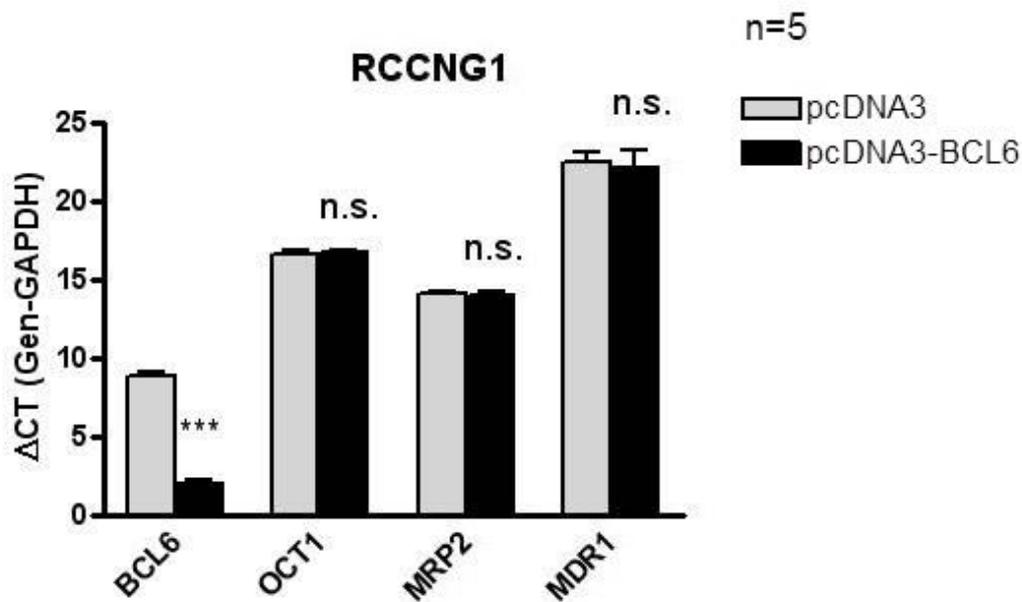


Abbildung 3.10: Beeinflussung der Expression von OATs, OATs, OCTs MRP2 und MDR1 durch BCL6-Überexpression in der Nierenkarzinomzelllinie RCCNG1.

Die Zellen wurden entweder mit dem Leervektor pcDNA3 (graue Balken) oder mit dem Expressionsplasmid pcDNA3-BCL6 (schwarze Balken) transfiziert. Die Daten wurden dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M.; n=5. Statistische Analyse durch *unpaired* t-Test: *** = $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant. Δ CT = Differenz zwischen dem untersuchten Gen und dem Haushaltsgen (GAPDH).

3.3.6. Zusammenfassung der real-time PCR-Analyse

In den Nierenkarzinomzelllinien 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1 wurde die Expression von OATs, OCTs und ABC-Transportern infolge der BCL6-Überexpression untersucht. Die Transfektion mit pcDNA3-BCL6 führte zu einer Überexpression des BCL6-Gens, aber zu keiner Änderung der untersuchten Transporter. Lediglich OCT1-mRNA wurde in der Zelllinie ACHN durch BCL6-Transfektion supprimiert. Die Suppression war statistisch signifikant, aber dennoch relativ gering. Aus diesem Grund wurde der Transporter OCT1 in der Zelllinie ACHN nicht weiter untersucht. Die folgende Tabelle (Tab. 3.1) gibt einen Überblick über die untersuchten Transporter. Außerdem wurden die Differenzen zwischen den pcDNA3- und pcDNA3-BCL6-transfizierten Zelllinien zusammengefasst.

Tabelle 3.1: **Tabellarische Zusammenfassung der real-time PCR-Analyse**

Diese Tabelle stellt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der real-time PCR dar. Es wird gezeigt, welche Transportproteine in den einzelnen Zelllinien exprimiert wurden und welche nicht. - = nicht detektiert; + = detektiert; n.u. = nicht untersucht; n.s. = nicht signifikant; * = $p < 0,05$.

| Transporter | OAT1 | OAT3 | OAT4 | OAT10 | OCT1 | OCT2 | OCT3 | MRP2 | MDR1 |
|---------------|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|
| Zelllinie | | | | | | | | | |
| 786-O | - | - | + | + | + | n.u. | n.u. | n.u. | n.u. |
| | | | n.s. | n.s. | n.s. | | | | |
| ACHN | - | - | - | + | + | n.u. | n.u. | n.u. | n.u. |
| | | | | n.s. | * | | | | |
| LN78 | - | - | - | + | + | n.u. | n.u. | n.u. | n.u. |
| | | | | n.s. | n.s. | | | | |
| RCCNG1 | - | - | n.u. | n.u. | + | - | - | + | + |
| | | | | | n.s. | | | n.s. | n.s. |

3.4. Untersuchung des BCL6-Proteins

In diesem Experiment wurde zur Untersuchung des BCL6-Proteins die immunhistochemische Färbung für alle untersuchten Nierenkarzinomzelllinien angewendet, nachdem BCL6 mithilfe der real-time PCR nachgewiesen wurde. Dazu wurden die Zelllinien 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1 in unabhängigen Versuchen mit pcDNA3 oder pcDNA3-BCL6 transfiziert. Die Immunfluoreszenz-Analyse von BCL6 zeigte in den Zellen der Nierenkarzinomzelllinie RCCNG1 BCL6-transfizierte Zellen (siehe Abb. 3.11). In dieser Zelllinie wurde BCL6 im Zellkern detektiert. Im Zytoplasma und in der Zellmembran konnte keine BCL6-Expression nachgewiesen werden. In RCCNG1-Zellen wurde BCL6 somit erfolgreich als Protein exprimiert. In den pcDNA3-transfizierten Kontrollzellen konnte keine endogene BCL6-Expression nachgewiesen werden (Abb. 3.11). Es wurden etwa 6,5 % RCCNG1-Zellen erfolgreich transfiziert. Bei der immunhistochemischen Analyse von BCL6 in den Zelllinien 786-O, ACHN und LN78 wurden BCL6-positive Zellkerne nur in geringer Anzahl detektiert. Dabei waren unter 1 % der Zellen nach der Transfektion mit pcDNA3-BCL6 BCL6-positiv (Abb. 3.12).

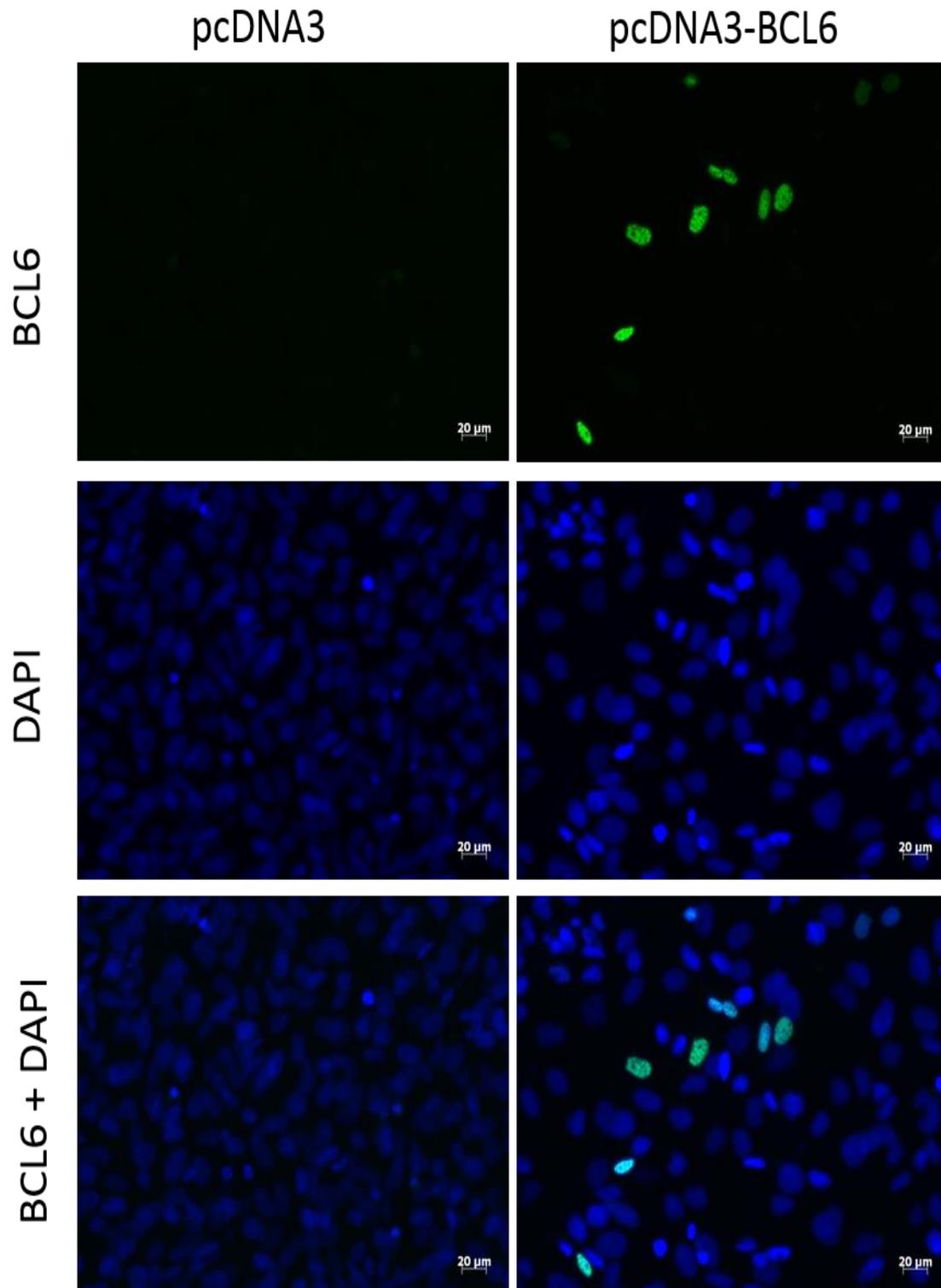


Abbildung 3.11: **BCL6-Expression in RCCNG1-Zellen. Immunhistochemische Färbung.**

Die Zellen der Zelllinie RCCNG1 wurden entweder mit dem Leervektor pcDNA3 oder mit dem Expressionsplasmid pcDNA3-BCL6 transfiziert und anschließend die Expression des BCL6-Proteins durch immunhistochemische Färbung analysiert. Als Primärantikörper wurde *monoconal mouse anti BCL6* eingesetzt, als Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 *goat anti-mouse IgG*. Zu sehen sind BCL6-transfizierte Zellkerne (grün) oder mit Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) gefärbte Zellkerne (blau); Auflösung 20 µm; Repräsentative Abbildung der Zelllinie RCCNG1.

Das folgende Säulendiagramm (Abb. 3.12) gibt einen Überblick über die immunhistochemische Analyse der BCL6-Expression nach der BCL6-Transfektion in den Nierenkarzinomzelllinien 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1. Dabei wird deutlich, dass die BCL6-Transfektion nur die Protein-Expression von BCL6 in der Nierenkarzinomzelllinie RCCNG1 beeinflusste.

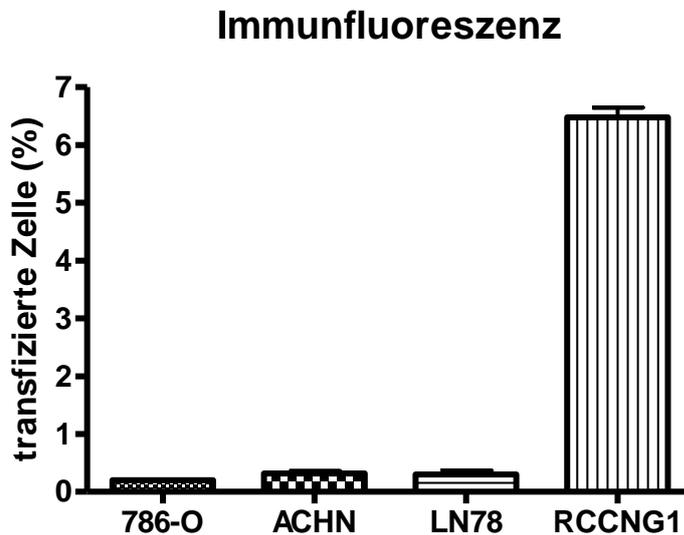


Abbildung 3.12: Immunfluoreszenz-Nachweis von BCL6 in 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1.

Überblick der immunhistochemischen Analyse der Zelllinien 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1. Die Zellen wurden entweder mit dem Leervektor pcDNA3 oder mit dem Expressionsplasmid pcDNA3-BCL6 transfiziert und anschließend die Expression des BCL6-Proteins durch immunhistochemische Färbung analysiert. Als Primärantikörper wurde *monoclonal mouse anti BCL6* eingesetzt, als Sekundärantikörper diente *Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG*. Die Balken zeigen jeweils an, wie viele Zellen der Zelllinien 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1 erfolgreich mit dem Expressionsplasmid pcDNA3-BCL6 transfiziert wurden.

3.5. Der Effekt von BCL6 auf die Chemosensitivität der Nierenkarzinomzelllinie RCCNG1

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Chemosensitivität der Nierenkarzinomzelllinie RCCNG1 durch BCL6-Transfektion erhöht wird. Dazu wurde der Einfluss verschiedener Zytostatika auf den programmierten Zelltod der Zelllinie RCCNG1 untersucht. Die Apoptose wurde in BCL6- und in Leervektor-transfizierten Zellen untersucht. Für diese Experimente wurden drei Agenzien verschiedener Wirkstoffklassen in verschiedenen Konzentrationen getestet: der Antimetabolit 5-Fluorouracil (5-FU), der Topoisomerase-Hemmer Irinotecan und das Platinderivat Oxaliplatin. Das Experiment wurde viermal durchgeführt. Die Induktion der Apoptose aktiviert Caspasen. In den folgenden Experimenten wurde nach 16-stündiger Inkubation mit den jeweiligen Zytostatika die Enzymaktivität der Caspase-3 gemessen. Zudem wurde untersucht, ob mit ansteigenden Konzentrationen des zugefügten Zytostatikums Apoptose induziert wird und welchen Einfluss der Transkriptionsfaktor BCL6

auf die Apoptose hat. Die Messungen wurden nach 30, 60 und 90 Minuten durchgeführt um zu analysieren, wann die Messung optimal ist.

3.5.1. Der Einfluss von BCL6 auf die Chemosensitivität von RCCNG1-Zellen gegenüber 5-Fluorouracil

Die pcDNA3- und pcDNA3-BCL6-transfizierte Zellen der Zelllinie RCCNG1 wurden 16 Stunden mit ansteigenden Konzentrationen 5-Fluorouracil (1 μ M, 10 μ M und 100 μ M) oder mit dem organischen Lösungsmittel DMSO (Dimethylsulfoxid) inkubiert. Anschließend wurde die Caspaseaktivität gemessen. Es wurden bei keiner der eingesetzten Konzentrationen signifikante Unterschiede zwischen den BCL6-transfizierten Zellen und Kontrollzellen nachgewiesen (Abb. 3.13). Nach der Inkubation der Zellen mit 10 μ M 5-FU wurde bei BCL6-transfizierten Zellen eine höhere Caspase-3-Aktivität gemessen als bei den Leervektor-transfizierten Zellen. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$). Bei den Konzentrationen 1 μ M und 100 μ M ist die Apoptoserate bei pcDNA3-transfizierten Zellen geringfügig höher.

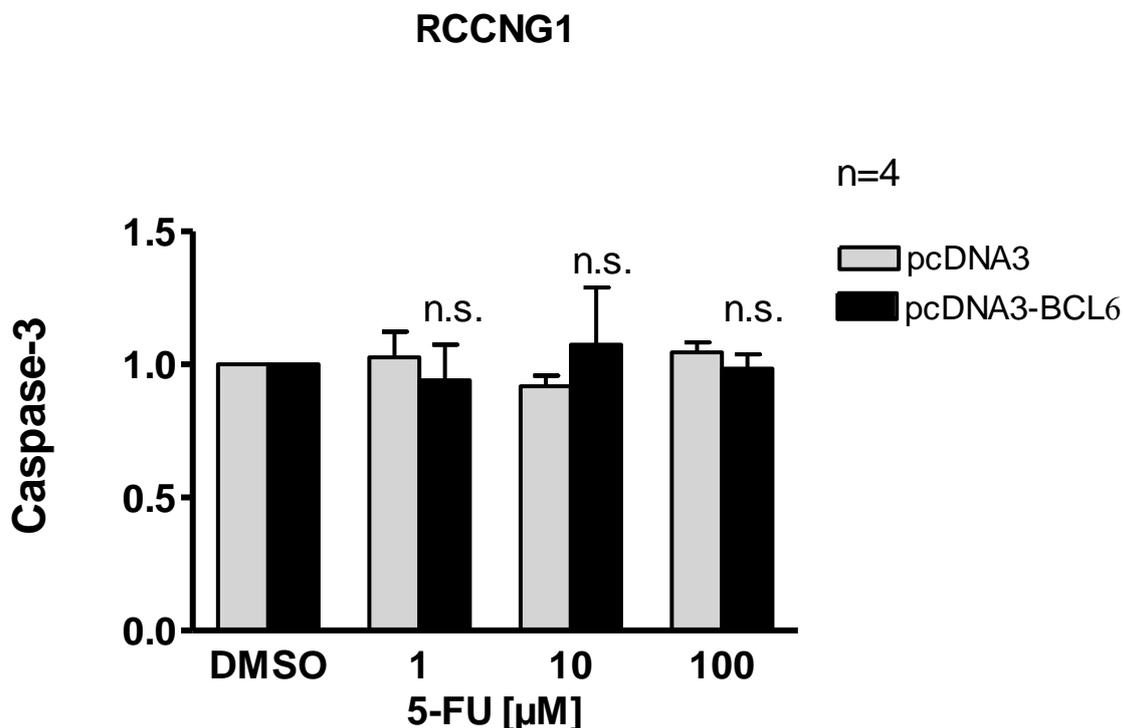


Abbildung 3.13: Caspaseaktivität nach Inkubation mit 5-FU.

Die RCCNG1-Zellen wurden nach der Transfektion mit dem Leervektor pcDNA3 (graue Balken) oder mit dem Expressionsvektor pcDNA3-BCL6 (schwarze Balken) entweder mit DMSO (Dimethylsulfoxid) als Kontrolle oder mit dem Zytostatikum 5-Fluorouracil in den Konzentrationen 1 μ M, 10 μ M sowie 100 μ M exponiert und 16 Stunden inkubiert. Die Caspaseaktivität wurde mithilfe des EnzChek® Caspase-3-Assay Kit # 2 gemessen. Die Daten wurden dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M.; n=4; n.s. = nicht signifikant. Statistische Analyse durch den zweiseitigen ungepaarten t-Test: Vergleich zwischen pcDNA3- und pcDNA3-BCL6-transfizierten Zellen. Der

Vergleich der verschiedenen Konzentrationen mit der Lösungsmittelkontrolle (Dimethylsulfoxid oder Wasser) erfolgte durch *one-way* ANOVA mit dem Dunnett's *multiple comparison*-Test.

3.5.2. Der Einfluss von BCL6 auf die Chemosensitivität von RCCNG1-Zellen gegenüber Irinotecan

In diesem Versuch wurden die Zellen 16 Stunden mit dem Zytostatikum Irinotecan inkubiert und die Caspaseaktivität untersucht. Auch Irinotecan induziert keine Apoptose von BCL6- und Leervektor-transfizierten Zellen (Abb. 3.14). Bei einer Konzentration von 10 μM wurde die höchste Caspase-3-Aktivität sowohl bei BCL6-transfizierten Zellen als auch bei den Kontrollzellen nachgewiesen. Bei den Leervektor-transfizierten Zellen konnte man bei der Konzentration von 10 μM Irinotecan eine höhere Caspaseaktivität nachweisen als bei BCL6-transfizierten RCCNG1-Zellen. Der Transkriptionsfaktor BCL6 führte zu keiner signifikant veränderten Chemosensitivität der RCCNG1-Zellen gegenüber Irinotecan.

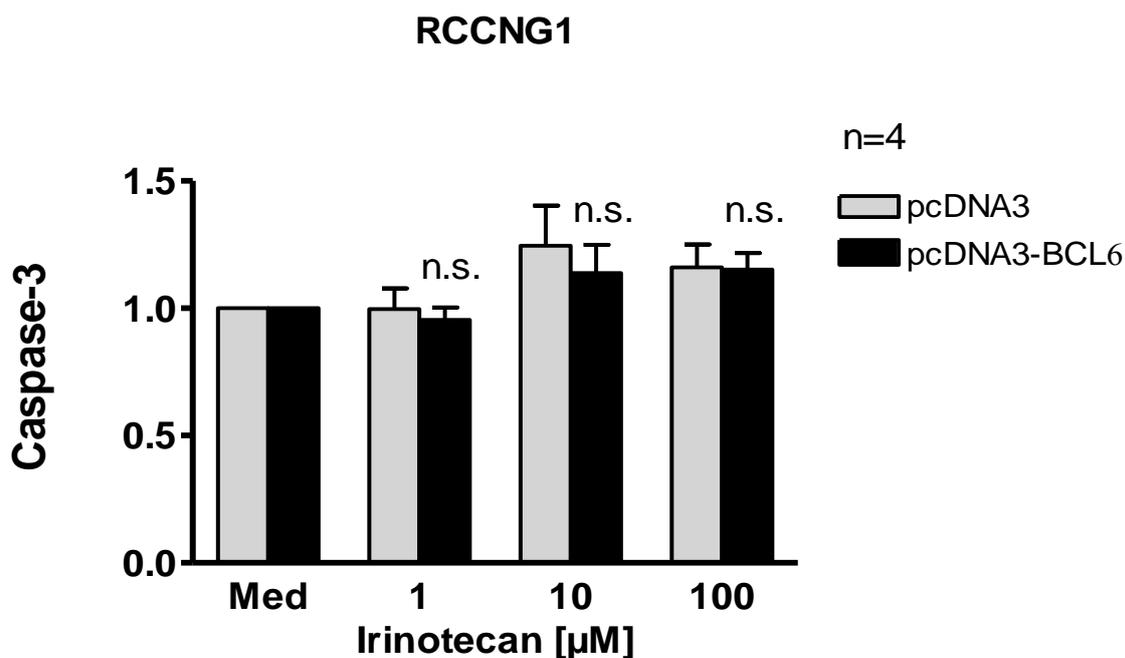


Abbildung 3.14: **Caspaseaktivität nach Inkubation mit Irinotecan.**

Die RCCNG1-Zellen wurden nach der Transfektion mit dem Leervektor pcDNA3 (graue Balken) oder mit dem Expressionsvektor pcDNA3-BCL6 (schwarze Balken) entweder mit Medium (Med) als Kontrolle oder mit dem Zytostatikum Irinotecan in den Konzentrationen 1 μM , 10 μM sowie 100 μM exponiert und 16 Stunden inkubiert. Die Caspaseaktivität wurde mithilfe des EnzChek® Caspase-3-Assay Kit # 2 gemessen. Die Daten wurden dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M.; n=4; n.s. = nicht signifikant. Statistische Analyse durch den zweiseitigen ungepaarten t-Test: Vergleich zwischen pcDNA3- und pcDNA3-BCL6-transfizierten Zellen. Der Vergleich der verschiedenen Konzentrationen mit der Lösungsmittelkontrolle (Dimethylsulfoxid oder Wasser) erfolgte durch *one-way* ANOVA mit dem Dunnett's *multiple comparison*-Test.

3.5.3. Der Einfluss von BCL6 auf die Chemosensitivität von RCCNG1-Zellen gegenüber Oxaliplatin

Das Zytostatikum Oxaliplatin wurde in diesem Experiment neben den Konzentrationen 1 μM , 10 μM und 100 μM zusätzlich mit der Konzentration 150 μM getestet. Dabei wurde bei der höchsten eingesetzten Konzentration die höchste Caspaseaktivität bei sowohl BCL6-transfizierten als auch pcDNA3-transfizierten Zellen nachgewiesen. Die Caspaseaktivität war bei den Konzentrationen 10 μM , 100 μM und 150 μM bei den Leervektor-transfizierten Zellen höher als bei den Zellen, die mit dem Expressionsplasmid BCL6 transfiziert wurden. Mit aufsteigender Oxaliplatin-Konzentration ist bei den Leervektor-transfizierten Zellen ein Trend zur höheren Apoptoserate zu erkennen, wenngleich mithilfe des Dunnett-Tests kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte.

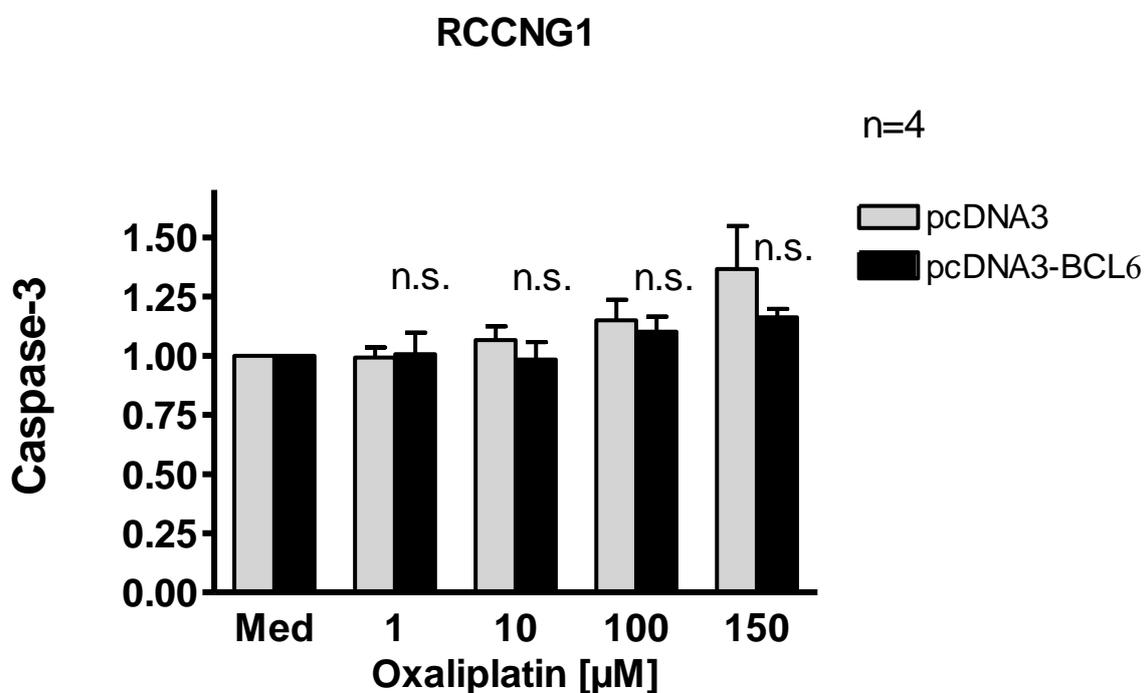


Abbildung 3.15: Caspaseaktivität nach Inkubation mit Oxaliplatin.

Die RCCNG1-Zellen wurden nach der Transfektion mit dem Leervektor pcDNA3 (graue Balken) oder mit dem Expressionsvektor pcDNA3-BCL6 (schwarze Balken) entweder mit Medium (Med) als Kontrolle oder mit dem Zytostatikum Oxaliplatin in den Konzentrationen 1 μM , 10 μM , 100 μM sowie 150 μM exponiert und 16 Stunden inkubiert. Die Caspaseaktivität wurde mithilfe des EnzChek® Caspase-3-Assay Kit # 2 gemessen. Die Daten wurden dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M.; n=4; n.s. = nicht signifikant. Statistische Analyse durch den zweiseitigen ungepaarten t-Test: Vergleich zwischen pcDNA3- und pcDNA3-BCL6-transfizierten Zellen. Der Vergleich der verschiedenen Konzentrationen mit der Lösungsmittelkontrolle (Dimethylsulfoxid oder Wasser) erfolgte durch *one-way* ANOVA mit dem Dunnett's *multiple comparison*-Test.

4. Diskussion

Das Nierenzellkarzinom nimmt mit weltweit schätzungsweise 271.000 Neuerkrankungen und 116.000 Todesfällen im Jahr 2008 stark an Inzidenz und Mortalität zu (Xu *et al.* 2014). In den meisten Fällen ist die Chemotherapie als Behandlungsmethode erfolglos (Martel und Lara 2003). Die Chemoresistenz beruht neben anderen Ursachen auf dem beschleunigten Zytostatika-Efflux aus den Karzinomzellen (Sharom 2008, Zhou 2008). Für den Efflux der Zytostatika sind unter anderem die ABC-Transporter MDR1 und MRP2 verantwortlich, welche in Tumorgewebe im Gegensatz zu gesunden Geweben erhöht exprimiert werden (Soini *et al.* 2001). Bisher ist nicht geklärt, ob die Chemoresistenz auch aus der herabgesetzten Aktivität der Influx-Transporter resultieren könnte (Huang 2007). Es wäre möglich, dass der durch SLC-Transporter vermittelte Influx bestimmter Zytostatika in die Nierenkarzinomzellen einen entscheidenden Punkt für die erfolgreiche Chemotherapie darstellen könnte. Es ist unklar, wie viele Zytostatika-Moleküle tatsächlich in die Karzinomzelle gelangen und welche Faktoren den Influx beeinflussen. Es stellt sich die Frage, ob man die Expression der SLC-Transportproteine in Nierenkarzinomzellen exogen beeinflussen und auf diese Weise eine Überexpression der Aufnahmetransporter induzieren kann. In der Vergangenheit wurden bereits einige Transkriptionsfaktoren (z.B. HNF1 und BCL6) nachgewiesen, welche die Expression der Transportproteine regulieren (Miles *et al.* 2005, Kikuchi *et al.* 2006, Saji *et al.* 2008, Jin *et al.* 2012, Wegner *et al.* 2012, Wegner *et al.* 2014). Erste Resultate über den Einfluss von B-cell CLL/lymphoma 6 (BCL6) auf Nierenzellen wurden von Wegner *et al.* veröffentlicht (Wegner *et al.* 2012). Die Arbeitsgruppe erbrachte später den Nachweis, dass BCL6 indirekt durch die Erhöhung des Transkriptionsfaktors *hepatocyte nuclear factor 1 alpha* (HNF1 α) die Expression des OAT1-Promotors erhöht (Wegner *et al.* 2014). Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse stellt sich die Frage, ob BCL6 auch einen Einfluss auf weitere OATs, OCTs und ABC-Transporter in Nierenkarzinomzellen ausüben könnte. In diesem Zusammenhang ist anzunehmen, dass Nierenkarzinomzellen durch eine erhöhte BCL6-induzierte Expression der SLC-Transporter sensitiver gegenüber Zytostatika werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Experimente auf molekularbiologischer, zellbiologischer, immunhistochemischer und pharmakologischer Ebene durchgeführt.

4.1. Nachweis des BCL6-Gens in den Nierenkarzinomzelllinien

Die verwendeten Nierenkarzinomzelllinien 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1 wurden entweder mit dem Leervektor pcDNA3 oder mit dem Expressionsplasmid pcDNA3-BCL6 transfiziert. Die präsentierten Daten der PCR-Analyse zeigen, dass die Nierenkarzinomzelllinien 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1 BCL6-mRNA auch endogen exprimieren (siehe Abb. 3.2 – 3.5). Dieses Ergebnis unterstützt die von Wagner *et al.*

beschriebene Annahme, dass BCL6 in Tumorzellen erhöht exprimiert sein könnte (Wagner *et al.* 2011). Die Arbeitsgruppe begründet diese Annahme damit, dass BCL6-mRNA ein Ziel für miR-127 (mikroRNA-127) darstellt (Saito *et al.* 2006). Dabei handelt es sich um eine kurze, nicht-kodierende RNA, welche durch sequenzspezifische Interaktion mit ihrer Ziel-mRNA deren Translation reprimieren kann. Da Karzinomzellen weniger miR-127 exprimieren als gesunde Zellen, könnte dies eine gesteigerte BCL6-Expression zur Folge haben (Wagner *et al.* 2011). Um herauszufinden, ob BCL6 in Nierenkarzinomzellen tatsächlich höher exprimiert ist als in gesunden Nierenzellen, müssten zum Vergleich Untersuchungen an gesunden Nierenzellen durchgeführt werden.

4.2. Beeinflussung der Expression renaler Transportproteine in 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1 durch BCL6

Da die Reaktion der Karzinomzellen auf die Chemotherapie von der intrazellulären Zytostatikakonzentration abhängig ist (Huang 2007), war das eigentliche Ziel der Untersuchungen herauszufinden, ob sich die Expression der Influx-Transporter der SLC22-Familie infolge der BCL6-Überexpression in den Nierenkarzinomzelllinien 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1 erhöhen lässt. Neben der Superfamilie der SLC-Membranproteine beeinflusst auch die Superfamilie der ABC-Transporter die Pharmakokinetik von Medikamenten (Huang 2007). Die MRPs sind ATP-getriebene Transportsysteme, die vornehmlich Zytostatika und andere Substrate aus der Zelle exportieren und somit deren Akkumulation in den Zellen verhindern (siehe Kapitel 1.4). Die Tatsache, dass Nierenkarzinomzellen *Multidrug-Resistance*-Transporter höher exprimieren als gesunde Zellen, unterstützt die Annahme, dass Nierenkarzinomzellen als chemoresistent anzusehen sind (Soini *et al.* 2001). Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich zu den SLC22-Transportern auch zwei Efflux-Transporter der ABC-Familie in der Nierenkarzinomzelllinie RCCNG1 untersucht. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die für den Zytostatika-Transport potentiellen SLC-Transporter. Im Anschluss werden die Ergebnisse der real-time PCR-Analyse diskutiert.

Tabelle 4.1: Mögliche Zytostatika-Transporter der SLC- und ABC-Familie

Transporter der SLC- und ABC-Familie, welche in dieser Arbeit untersucht wurden und mit Zytostatika interagieren. + = Interaktion, u = unbekannt (Toffoli *et al.* 2003, Yonezawa *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2006, Kusuhara und Sugiyama 2009, Shnitsar *et al.* 2009).

| Transporter | 5-Flourouracil | Irinotecan | Oxaliplatin |
|-------------|----------------|------------|-------------|
| OAT1 | u | u | u |
| OAT3 | u | u | u |
| OAT4 | u | u | u |
| OAT10 | u | u | u |
| OCT1 | u | + | + |
| OCT2 | u | u | + |
| OCT3 | u | + | + |
| MRP2 | u | + | u |
| MDR1 | u | + | u |

4.2.1. Beeinflussung der Expression der Influx-Transporter in 786O, ACHN, LN78 und RCCNG1 durch BCL6

In den Experimenten wurde die Expression von OAT1, OAT3, OAT4 und OAT10 in pcDNA3-BCL6- und in Leervektor pcDNA3-transfizierten Nierenkarzinomzelllinien 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1 untersucht. Die Transporter OAT1 und OAT3 konnten in keiner der untersuchten Nierenkarzinomzelllinien nachgewiesen werden. Diese beiden Organischen-Anionen-Transporter sind für die Aufnahme einer Vielzahl von negativ geladenen Arzneimitteln vom Blut in die proximalen Nierentubuluszellen verantwortlich (Burckhardt und Burckhardt 2003). Es ist bekannt, dass OAT1 und OAT3 das Zytostatikum Methotrexat transportieren (Takeda *et al.* 2002, Burckhardt und Burckhardt 2011, Burckhardt 2012). Aus diesem Grund wurde angenommen, dass OAT1 und OAT3 auch für den Influx anderer Zytostatika verantwortlich sein könnten. Da Gupta *et al.* die OAT3-Expression sowohl in Leukämiezellen als auch bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie nachgewiesen haben (Gupta *et al.* 2011a), war eine OAT3-Expression auch in anderen Karzinomzellen denkbar. Die Tatsache, dass DNA-Methylierung die Promotoraktivität des OAT1 und des OAT3 unterdrückt (Kikuchi *et al.* 2006, Jin *et al.* 2012), könnte eine mögliche Ursache dafür sein, dass die beiden Transporter in den Karzinomzelllinien nicht nachgewiesen werden konnten. Interessanterweise konnten Hagos *et al.* erstmalig in RCCNG1-Zellen die Expression von OAT1 durch Transfektion mit dem Transkriptionsfaktor *hepatocyte nuclear factor 4 alpha* (HNF4 α) nachweisen und im Gegensatz zu Leervektor-transfizierten Zellen erhöhen (Hagos *et al.* 2014). Allerdings war der mRNA-Level von OAT1 in dieser Studie sehr niedrig und konnte erst nach etwa 36 PCR-Zyklen detektiert werden. Dennoch stützt das Ergebnis von Hagos *et al.* (2014) die Annahme, dass OAT1-mRNA

durch Transkriptionsfaktoren moduliert werden kann. Die möglichen Gründe, warum BCL6 keinen Effekt auf die OAT1-Expression in RCCNG1-Zellen ausübt, werden weiter unten diskutiert (siehe Kapitel 4.3).

Derzeit liegen keine Berichte über die spezifische Expression des OAT4 in Karzinomzellen vor (Gupta *et al.* 2011a). Nur in der Nierenkarzinomzelllinie 786-O wurde die mRNA des asymmetrischen Antiporters OAT4 nachgewiesen (siehe Tab. 3.1). Die Karzinomzelllinien ACHN und LN78 haben dieses Transportprotein nicht exprimiert. Dieses Ergebnis zeigt, dass sich die exprimierten Transporter zwischen Nierenkarzinomzelllinien verschiedener Patienten unterscheiden.

Des Weiteren wurde OAT10 in den Zelllinien 786-O, ACHN und LN78 untersucht und detektiert. Allerdings zeigen die präsentierten Daten, dass sich die Expression von OAT10 in BCL6-transfizierten Zellen im Vergleich zu Leervektor-transfizierten Zellen nicht signifikant änderte. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der Transkriptionsfaktor BCL6 keinen Einfluss auf die Expression von OAT10 in Nierenkarzinomzelllinien hat. In diesem Zusammenhang ist hinzuzufügen, dass bis zum heutigen Zeitpunkt hierzu noch keine Experimente durchgeführt wurden. Es bleibt unklar, ob die Genexpression vom Typ des Nierenzellkarzinoms abhängig sein könnte. Sültmann *et al.* konnten beispielsweise nachweisen, dass die Genexpression des MDR1 nur im papillären Typ des Nierenzellkarzinoms, nicht aber im Klarzellkarzinom erhöht wird (Sültmann *et al.* 2005).

Da OCTs eine breite Substratspezifität aufweisen, könnten auch diese Transportproteine eine Rolle in der Chemosensitivität der Karzinomzellen spielen (Koepsell *et al.* 2007). In der Vergangenheit konnte in den Untersuchungen von Hayer-Zillgen *et al.* die Expression von OCTs in verschiedenen humanen Karzinomzelllinien nachgewiesen werden (Hayer-Zillgen *et al.* 2002). In den vorliegenden Experimenten wurde daher die Expression von OCT1, OCT2 und OCT3 untersucht. Die mRNA der drei Transportproteine konnten bisher gemeinsam nur in der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 nachgewiesen werden (Bleasby *et al.* 2000, Hayer-Zillgen *et al.* 2002). Untersuchungen von Heise *et al.* ergaben, dass OCT1 und OCT3 in Zellen des hepatozellulären Karzinoms herunterreguliert werden (Heise *et al.* 2012). Es ist bekannt, dass OCT1 Zytostatika transportieren kann (Zhang *et al.* 2006, Gupta *et al.* 2011a). OCT1 konnte in den vorliegenden Versuchen in allen vier untersuchten Nierenkarzinomzelllinien nachgewiesen werden. In der Zelllinie ACHN wurde die Expression von OCT1 entgegen der Erwartungen durch Transfektion mit BCL6 supprimiert. Dieses Ergebnis zeigt, dass BCL6 einen negativen Einfluss auf die OCT1-Expression in der Zelllinie ACHN hat. Die Suppression war statistisch signifikant, aber relativ gering. Deshalb wurde das Transportprotein OCT1 in der Zelllinie ACHN nicht weiter untersucht. In einer Studie von

Hagos *et al.* konnte OCT1-mRNA in der Zelllinie RCCNG1 durch Überexpression des Transkriptionsfaktors HNF4 α signifikant erhöht werden (Hagos *et al.* 2014). OCT2 vermittelt die Aufnahme des Zytostatikums Cisplatin in die proximalen Nierentubuli und ist somit für die Nephrotoxizität dieses Arzneimittels verantwortlich (Ciarimboli *et al.* 2005). Aus diesem Grund wurde OCT2 in der Karzinomzelllinie RCCNG1 untersucht. Eine erhoffte Expression dieses Transporters blieb jedoch aus. Hagos *et al.* konnten OCT2 in RCCNG1-Zellen nach 40 PCR-Zyklen ebenfalls nicht nachweisen (Hagos *et al.* 2014). Eine veränderte Expression des OCT3 konnte bisher in verschiedenen Karzinomen festgestellt werden (Shnitsar *et al.* 2009, Heise *et al.* 2012). OCT3 wurde nur in RCCNG1-Zellen untersucht und nach 40 PCR-Zyklen nicht detektiert. Shnitsar *et al.* konnten OCT3 in RCCNG1-Zellen nach 30 PCR-Zyklen nicht nachweisen (Shnitsar *et al.* 2009). Da Shnitsar *et al.* jedoch erstmals die Expression und auch Funktionalität des OCT3 in einer Nierenkarzinomzelllinie (Zelllinie A498) nachweisen konnten (Shnitsar *et al.* 2009), haben wir zu Beginn der Untersuchungen auch eine Expression des OCT3 in RCCNG1-Zellen vermutet. Spätere Untersuchungen zeigten die Expression des OCT3 in 786-O, ACHN und LN78, wobei unterschiedliche Expressionslevel des Transporters ausgemacht werden konnten (Hagos *et al.* 2014, Marada 2014).

Die Karzinomzellen verfügen über verschiedene epigenetische und genetische Mechanismen, mit denen sie ihre Genexpression verändern können (Shen *et al.* 2012). Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnis kann die Hypothese aufgestellt werden, dass Nierenkarzinomzellen aufgrund veränderter Genexpression die Expression von Influx-Transportern als eine Art Selbstschutzmechanismus herunterregulieren. Ein mögliches Beispiel für einen solchen Mechanismus ist die hoch- und herunterregulierte Expression von mikroRNA (miRNA) in Karzinomzellen (Masereeuw und Russel 2012, Shen *et al.* 2012). Die miRNAs sind in der Lage, die Genexpression durch Repression der Translation der Ziel-mRNA oder durch RNA-Abbau zu beeinflussen (Iorio *et al.* 2005). Die Beeinflussung der Genexpression durch miRNAs kann sowohl durch Herunterregulierung als auch durch Hochregulierung der Translation der mRNA erfolgen (Valinezhad Orang *et al.* 2014). In der Literatur wird berichtet, dass miRNAs die Expression von Transportproteinen beeinflussen können (Pullen *et al.* 2011, Masereeuw und Russel 2012). In einer Doktorarbeit der Abteilung konnte kein Einfluss von untersuchten miRNAs auf die Expression des Influx-Transporters OCT3 in Nierenkarzinomzellen gezeigt werden (Marada 2014). Ein weiteres Beispiel für eine veränderte Genexpression von Transportproteinen in den Karzinomzellen stellen DNA-Methylierungen und Histon-Modifizierungen dar (Masereeuw und Russel 2012). Diese epigenetischen Mechanismen haben einen Einfluss auf die Expression einiger SLC-Transporter in Kolonkarzinomzelllinien (Ikehata *et al.* 2012). Marada erbrachte hingegen den

Nachweis, dass sowohl Deacetylierung der Histone als auch DNA-Methylierung nicht für eine verminderte OCT3-Expression in ACHN-Zellen verantwortlich sind (Marada 2014). Im Gegensatz dazu wurden die Promotoraktivitäten von OAT1 und OAT3 durch DNA-Methylierung unterdrückt (Kikuchi *et al.* 2006, Jin *et al.* 2012).

4.2.2. Beeinflussung der Expression der Efflux-Transporter MDR1 und MRP2 in RCCNG1 durch BCL6

Im Gegensatz zu bereits publizierten Daten (Shnitsar *et al.* 2009), in denen MDR1 in der Karzinomzelllinie RCCNG1 mithilfe der Standard-PCR nicht detektiert werden konnte, wurde MDR1 in dieser Arbeit mithilfe der real-time PCR-Analyse in RCCNG1 nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Arbeitsgruppe Shnitsar *et al.* nur bis PCR-Zyklus 30 amplifiziert hat, die Experimente der vorliegenden Arbeit hingegen bis Zyklus 40 durchgeführt wurden. Das ermittelte Expressionsprofil der real-time PCR zeigt, dass die Expression der MDR1-mRNA relativ niedrig ist. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass die Ursache für die Chemoresistenz der Nierenkarzinomzelllinie RCCNG1 nicht in der Expression des ABC-Transporters MDR1 zu suchen ist. MRP2 ist klinisch sehr wichtig, da es die Pharmakokinetik vieler Medikamente moduliert und die Expression sowie die Aktivität dieses Transportproteins durch bestimmte Medikamente und Krankheitsstadien verändert werden kann (Gerk und Vore 2002). Die veränderte Funktion des MRP2-Transporters kann die Clearance vieler klinisch wichtiger Arzneimittel verändern. Dazu zählen u.a. Zytostatika (Irinotecan, Methotrexat und Vinblastin) und verschiedene Antibiotika (Gerk und Vore 2002). In den vorliegenden Experimenten wurde MRP2 in RCCNG1-Zellen höher exprimiert als der ABC-Transporter MDR1 und die Transportproteine OCT1 und OCT2. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass MRP2 zur Chemoresistenz der Nierenkarzinomzelllinie RCCNG1 beitragen könnte. Der Transkriptionsfaktor BCL6 hat in RCCNG1 Zellen jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von MRP2. Für die erhöhte Expression des Transporters MRP2 in RCCNG1-Zellen können jedoch verschiedene andere Faktoren verantwortlich sein. Zu diesen Faktoren könnten die veränderte Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren in Karzinomzellen, Gen-Polymorphismen, Genumlagerungen und Hypo- oder Hypermethylierungen der Promotoren zählen (Kim *et al.* 2006, Masereeuw und Russel 2012).

Weiterhin ist zu erwähnen, dass auch experimentelle Ursachen zu den erzielten Ergebnissen geführt haben könnten. Da die RNA in den vorliegenden Experimenten 48 Stunden nach der BCL6-Transfektion isoliert wurde, könnte es möglich sein, dass die RNA nach dieser Inkubationszeit bereits abgebaut war. Experimente, die eine Zeitreihenanalyse mit einschließen, müssten sich anschließen, um diese Vermutung endgültig zu bestätigen.

4.3. Nachweis des BCL6-Proteins in den Nierenkarzinomzelllinien

Die Auswertung der Daten zeigte, dass eine hohe BCL6-Expression auf mRNA-Ebene vorliegt. Dennoch war unklar, warum BCL6 keinen Einfluss auf die Aktivierung der untersuchten Transportproteine hat. Aufgrund dessen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Antikörperfärbung in der Arbeitsgruppe etabliert, mit der BCL6 in den untersuchten Nierenkarzinomzelllinien als Protein nachgewiesen werden sollte. Die immunhistochemische Färbung diente dem Nachweis, ob die Translation, die Synthese des BCL6-Proteins in den Nierenkarzinomzelllinien, erfolgreich war. Dazu wurden die Zelllinien 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1 entweder mit pcDNA3 oder pcDNA3-BCL6 transfiziert und anschließend die Expression des BCL6-Proteins durch immunhistochemische Färbung analysiert. Eine Expression des BCL6-Proteins konnte mithilfe der Immunfluoreszenz-Analyse nur für die Zelllinie RCCNG1 nachgewiesen werden. Dadurch wird bestätigt, dass mit BCL6-transfizierte RCCNG1-Zellen den Transkriptionsfaktor BCL6 im Zellkern exprimieren. Obwohl das Plasmid pcDNA3-BCL6 exogen zugefügt wurde, wird das Gen in den Zelllinien 786-O, ACHN und LN78 nicht translatiert. Die Tatsache, dass das BCL6-Protein nur in der Nierenkarzinomzelllinie RCCNG1 geringfügig nachweisbar ist, lässt vermuten, dass der Prozess der Translation in den anderen untersuchten Nierenkarzinomzelllinien gestört sein könnte. Da Karzinomzellen generell ihre Genexpression verändern können (Shen *et al.* 2012), wäre es zum einen vorstellbar, dass die Nierenkarzinomzelllinien 786-O, ACHN und LN78 über einen Mechanismus verfügen, mit dem sie RNA schneller abbauen können, sodass eine Synthese von Proteinen anhand von mRNA in den Ribosomen nicht mehr möglich ist. Zum anderen wäre möglich, dass die Nierenkarzinomzelllinien das Gen trotz Transfektion mit dem Expressionsplasmid BCL6 nicht translatieren. Das Gen-Expressionsmuster der Zelllinie RCCNG1 ähnelt proximalen Tubuluszellen mehr als die anderen untersuchten Nierenkarzinomzelllinien (Hagos *et al.* 2014). Diese Tatsache könnte eine mögliche Ursache dafür sein, dass nur die Zelllinie RCCNG1 BCL6 als Protein exprimiert.

4.4. Einfluss des BCL6-Proteins auf die Chemosensitivität von RCCNG1-Zellen

Da das BCL6-Protein nur in der Karzinomzelllinie RCCNG1 nachgewiesen werden konnte, wurden die Zelllinien 786-O, ACHN und LN78 in dieser Phase der Experimente vernachlässigt.

So wurde in den vorliegenden Experimenten untersucht, ob sich die Chemosensitivität der Nierenkarzinomzelllinie RCCNG1 gegenüber ausgewählten Zytostatika (siehe Tab. 4.1)

durch BCL6-Überexpression erhöhen lässt. Die RCCNG1-Zellen wurden dafür nach der Transfektion mit dem Leervektor pcDNA3 oder mit dem Expressionsvektor pcDNA3-BCL6 16 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen eines der drei ausgewählten Zytostatika behandelt. Im Anschluss wurde die Caspase-3-Aktivität gemessen.

Zunächst wurde der Effekt von BCL6 auf die Chemosensitivität der RCCNG1-Zellen gegenüber 5-Fluorouracil (5-FU) getestet. Der Pyrimidin-Antimetabolit 5-FU wurde 1957 entwickelt (Heidelberger *et al.* 1957). 5-FU wird intrazellulär durch verschiedene Phosphorylierungsschritte zu seinen aktiven Metaboliten 5-Fluorodeoxyurinmonophosphat (5-FdUMP), 5-Fluorodeoxyuridintriphosphat (5-FdUTP), oder Fluorouridintriphosphat (5-FUTP) umgewandelt (Schilsky 1998). Die aktiven Metaboliten 5-FdUTP bzw. 5-FUTP können aufgrund ihrer Strukturähnlichkeit mit den Pyrimidinbasen Cytosin, Thymin und Uracil in die DNA bzw. RNA eingebaut werden (Schilsky 1998). Auf diese Weise hemmt 5-FU die DNA- und RNA-Synthese und wirkt somit zytotoxisch (Schilsky 1998). Zudem hemmt 5-FdUMP das Enzym Thymidylat-Synthase und inhibiert dadurch ebenfalls die DNA-Synthese (Schilsky 1998). Seit einigen Jahren wird 5-FU in Form von kontinuierlichen intravenösen Infusionen als Kombinationstherapie mit anderen Therapien zur Behandlung des Nierenzellkarzinoms eingesetzt (Gebrosky *et al.* 1997). Die Kombinationstherapie besteht meist aus der Kombination aus Interleukin-2, Interferon- α und 5-FU (Dempke 2006). 5-FU ist ein nachgewiesenes Substrat des OAT2 (Kobayashi *et al.* 2005). Die präsentierten Daten zeigen, dass sowohl Leervektor-transfizierte als auch BCL6-transfizierte RCCNG1-Zellen nach 16-stündiger Inkubation mit 5-FU nicht mit Apoptose reagieren. Im Gegensatz dazu wurde in der Arbeit von Hagos *et al.* die Caspase-3-Aktivität in HNF4 α -transfizierten RCCNG1-Zellen nach 16-stündiger Inkubation mit sowohl 1 μ M als auch 10 μ M 5-FU signifikant erhöht (Hagos *et al.* 2014). Der wahrscheinlichste Grund für den Unterschied zwischen dem erzielten Ergebnis und den von Hagos *et al.* publizierten Daten ist die Verwendung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren.

Es bleibt außerdem zu klären, ob weitere, in dieser Arbeit nicht untersuchte Transportproteine zur Chemosensitivität der RCCNG1-Zellen gegenüber 5-FU beitragen. Die Arbeitsgruppe Pratt *et al.* konnte in Experimenten an mit MRP5 transfizierten HEK293-Zellen (Zellen aus humaner embryonaler Niere) die MRP5-vermittelte Chemoresistenz gegenüber 5-FU detektieren (Pratt *et al.* 2005). Als mögliche weitere Transporter kommen die equilibrativen Nucleosid-Transporter 1-3 (*equilibrative nucleoside transporter*, ENT1, ENT2, ENT3) der SLC29-Familie für einen gesteigerten Efflux oder verminderten Influx von 5-FU in Frage. Shnitsar konnte die Transporter ENT1-3 in RCCNG1-Zellen nachweisen und hat eine Affinität von ENT1 und ENT2 für 5-FU beschrieben (Shnitsar 2008). Hagos *et al.* konnten die mRNA von ENT1, ENT2 und ENT3 nach 28-29 PCR-Zyklen in RCCNG1-Zellen nachweisen (Hagos *et al.* 2014). Die Arbeitsgruppe hat zudem den konzentrativen Nucleosid-Transporter

3 (*concentrative nucleoside transporter 3*, CNT3), ein Membrantransporter der SCL28-Familie, als Kandidaten für die 5-FU-induzierte Chemosensitivität in RCCNG1-Zellen beschrieben (Hagos *et al.* 2014). CNT3 steigert die Akkumulation von 5-Fluorodeoxyuridin (5-FUDR), dem Metabolit von 5-FU (Hagos *et al.* 2014).

Als weiteres Zytostatikum wurde für die Experimente der Topoisomerase-I-Inhibitor Irinotecan ausgewählt. Irinotecan wird in Kombination mit 5-FU und Folinsäure (FOLFIRI) zur Behandlung des kolorektalen Karzinoms eingesetzt (Lee *et al.* 2005). Irinotecan ist ein halbsynthetisches Camptothecin-Derivat. Das Alkaloid Camptothecin wird aus der Pflanze *Camptotheca acuminata* isoliert. Irinotecan ist ein Prodrug, welches in der Leber durch Carboxylesterasen in die aktive Form SN38 metabolisiert wird (Rivory *et al.* 1996, Wu *et al.* 2002, Ramesh *et al.* 2010). Die Bindung von SN38 an die DNA-Topoisomerase-I bewirkt eine Enzymhemmung. Die Topoisomerase-I ist für die DNA-Replikation, die RNA-Translation und den Zellzyklus essentiell (Rothenberg 1997). Durch Glucuronidierung wird SN38 in der Leber zu SN38-Glucuronid inaktiviert. Auch nach 16-stündiger Inkubation mit Irinotecan wurde keine Apoptose in den RCCNG1-Zellen induziert. BCL6 kann die Chemosensitivität der RCCNG1-Zellen gegenüber Irinotecan nicht beeinflussen. Die Tatsache, dass die Zellen der Karzinomzelllinie RCCNG1 auf Irinotecan nicht mit Apoptose reagieren, könnte zu einem darauf zurückzuführen sein, dass die intrazelluläre Wirkkonzentration von Irinotecan nicht ausreichend ist, um zytotoxisch wirksam zu sein. Shnitsar *et al.* zeigten, dass der Aufnahmetransporter OCT3 die Aufnahme von Irinotecan vermittelt (Shnitsar *et al.* 2009), doch dieser Transporter wurde in RCCNG1-Zellen nicht exprimiert. Zudem wurde die Interaktion von OCT1 mit Irinotecan beschrieben (Gupta *et al.* 2011b). OCT1 wird in der untersuchten Zelllinie RCCNG1 exprimiert und könnte somit u.a. für die Aufnahme von Irinotecan in RCCNG1-Zellen verantwortlich sein. Dennoch stellt sich die Frage, warum sich RCCNG1-Zellen trotz wahrscheinlicher intrazellulärer Anreicherung des Arzneimittels den zelltoxischen Einflüssen des Zytostatikums entziehen und durch hohe Zytostatikagaben nicht in ihrem autonomen Zellwachstum gehindert werden. In diesem Prozess spielen wahrscheinlich die Efflux-Transporter eine Rolle. Irinotecan gilt als Substrat für den Efflux-Transporter MDR1 (Toffoli *et al.* 2003, Kusuhara und Sugiyama 2009). Damit kann festgehalten werden, dass die intrazelluläre Konzentration des aktiven Metaboliten SN38 von drei Faktoren abhängig ist: von der Carboxylesteraseaktivität, der UDP-Glucuronosyltransferaseaktivität und von der Aktivität des Efflux-Transporters MDR1. Da die Expression der MDR1-mRNA in den präsentierten Daten als niedrig nachgewiesen werden konnte, ist der Transporter MDR1 nicht als wahrscheinliche Ursache für einen vermehrten Efflux von SN38 zu werten. Der Transport von Irinotecan durch den MRP2 konnte bisher *in-vitro* nachgewiesen werden (Chen und Tiwari 2011). Diese Erkenntnis lässt die Annahme zu,

dass RCCNG1-Zellen auf das Zytostatikum Irinotecan nicht mit Apoptose reagieren, da das Medikament durch den in der Zelllinie RCCNG1 exprimierten Transporter MRP2 vermehrt aus den Karzinomzellen heraustransportiert wird. Genauso könnten auch andere Transporter am Efflux des Medikaments beteiligt sein. Mögliche Kandidaten wären die *Multidrug-and-Toxin-Extrusion*-Transporter 1 und 2 (MATE1 und MATE2) der SLC47-Familie, die beide in der luminalen Membran der proximalen Tubuluszellen exprimiert werden (Otsuka *et al.* 2005, Masuda *et al.* 2006). MATE-Transportproteine sezernieren sowohl endogene als auch exogene Substanzen. Es wurde bereits gezeigt, dass das Zytostatikum Oxaliplatin von MATE1 und MATE2-K transportiert wird (Yonezawa *et al.* 2006). MATE1 transportiert zudem die Zytostatika Topotecan (Tanihara *et al.* 2007) und Cisplatin (Yonezawa *et al.* 2006). Obwohl MATE1 insbesondere als Efflux-Transportprotein beschrieben wird (Otsuka *et al.* 2005, Tanihara *et al.* 2007), konnte MATE1 in einigen Studien als Aufnahmetransporter nachgewiesen werden (Chen *et al.* 2007, Watanabe *et al.* 2010, Minematsu und Giacomini 2011). Grottker *et al.* konnten in Experimenten eine Interaktion von MATE1 mit Irinotecan nachweisen, lieferten jedoch keine endgültige Aussage, ob MATE1 den Transport von Irinotecan vermittelt (Grottker *et al.* 2011).

Als drittes Zytostatikum wurde in den durchgeführten Experimenten die antineoplastische Substanz Oxaliplatin ausgewählt. Oxaliplatin ist ein Platinderivat der dritten Generation, das insbesondere zur Behandlung des kolorektalen Karzinoms, häufig in Kombination mit 5-FU und Folinsäure (FOLFOX-Therapieschema), eingesetzt wird (De Gramont *et al.* 2000, Van Cutsem *et al.* 2010). Im Gegensatz zum Zytostatikum Cisplatin induziert Oxaliplatin keine Nephrotoxizität und weist somit ein günstigeres Toxizitätsprofil auf (Raymond *et al.* 2002). Die antitumorale Wirkung von Oxaliplatin soll auf der Bildung von Di-Platin-DNA-Addukten und deren Interaktion mit der DNA beruhen, wodurch die DNA-Replikation und -Transkription gestört werden (Rothenberg 2000). Die durch die Platinierung entstandenen DNA-Schäden induzieren den programmierten Zelltod (Todd und Lippard 2009). Oxaliplatin ist ein bekanntes Substrat des OCT1 und des OCT2 (Yonezawa *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2006). Die präsentierten Daten zeigen, dass OCT1 in der Nierenkarzinomzelllinie RCCNG1 exprimiert ist und damit zur Aufnahme von Oxaliplatin in die RCCNG1-Zellen beitragen könnte. Da die Zytotoxizität und Akkumulation von Oxaliplatin insbesondere durch die Expression von OCT1 (Zhang *et al.* 2006) und OCT2 (Yonezawa *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2006) erhöht wird, war eine Oxaliplatin-induzierte Apoptose der RCCNG1-Zellen zu erwarten. Die erzielten Ergebnisse zeigen allerdings zum einen, dass Oxaliplatin keine Apoptose in RCCNG1-Zellen auslöst, und zum anderen, dass BCL6 keinen positiven Effekt auf die Chemosensitivität der RCCNG1-Zellen gegenüber Oxaliplatin bewirkt. Oxaliplatin ist ein Substrat für die Transporter OCT1, OCT2, OCT3, MATE1 und MATE2-K (Yonezawa *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2006, Lovejoy *et al.* 2008, Burger *et al.* 2010). Des Weiteren sind die in dieser Arbeit nicht

betrachteten Zwitterionen-/Kationentransporter OCTN1 und OCTN2 (Organische-Kationen/Carnitin-Transporter) der SLC22-Familie an der Aufnahme von Oxaliplatin beteiligt (Jong *et al.* 2011). Es wäre möglich, dass RCCNG1-Zellen verschiedene, in dieser Arbeit nicht untersuchte Efflux-Transporter überexprimieren könnten, welche Oxaliplatin vermehrt aus den Zellen heraustransportieren. Dazu zählen die Transporter MATE1 und MATE2-K, die bereits mit dem Oxaliplatin-Efflux aus proximalen Tubuluszellen in Zusammenhang gebracht wurden (Yonezawa *et al.* 2006, Yokoo *et al.* 2007). Eine verringerte intrazelluläre Oxaliplatin-Konzentration wurde auch durch eine erhöhte Expression der Transporter MRP1 und MRP4 in Ovarialkarzinomzellen beschrieben (Beretta *et al.* 2010). Shnitsar *et al.* konnten zeigen, dass MRP4 in 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1 exprimiert ist (Shnitsar *et al.* 2009). Aus diesem Grund müssten für eine vollständige Erklärung der Chemoresistenz von RCCNG1-Zellen auch die Transportproteine MATE1, MATE2-K, MRP1 und MRP4 berücksichtigt und untersucht werden. Des Weiteren könnten andere Transkriptionsfaktoren einen Einfluss auf die Oxaliplatin-induzierte Apoptose in RCCNG1-Zellen haben. Hagos *et al.* haben den Effekt des Transkriptionsfaktors HNF4 α auf die Chemosensitivität von RCCNG1-Zellen gegenüber Oxaliplatin untersucht und konnten beobachten, dass die Caspaseaktivität in HNF4 α -transfizierten RCCNG1-Zellen im Gegensatz zu Kontrollzellen signifikant erhöht wird (Hagos *et al.* 2014).

4.5. Einfluss weiterer Faktoren auf die Nierenkarzinomtherapie

Es bleibt zu diskutieren, welche anderen Zielstrukturen und Strategien zur gezielten Karzinomtherapie eingesetzt werden könnten. Einen möglichen Ansatzpunkt stellen miRNAs dar. In der Vergangenheit wurden verschiedene miRNAs beobachtet, welche die Chemosensitivität von Cisplatin-resistenten Zelllinien durch Regulation der Apoptose erhöhen können (Shen *et al.* 2012). Diese Tatsache lässt die Annahme zu, dass miRNAs möglicherweise auch die Chemosensitivität der Zelllinie RCCNG1 beeinflussen könnten. Untersuchungen von Xu *et al.* an Nierenkarzinomzelllinien ergaben, dass mi182-5p in Nierenkarzinomzelllinien herunterreguliert ist und eine induzierte Überexpression dieser miRNA die Proliferation der Karzinomzellen supprimiert (Xu *et al.* 2014). Einen weiteren möglichen Ansatzpunkt stellt der Wnt-Signalweg dar, welcher die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung reguliert (MacDonald *et al.* 2009). Die Fehlregulation des Wnt-Signalwegs wird mit der Tumorentstehung, -progression und -aggressivität verschiedener Organe in Verbindung gebracht (Waalder *et al.* 2011). Die Signalmoleküle der Wnt-Signalwege sind Wnt-Proteine. Eine zentrale Rolle dieser Signalkaskade nimmt das intrazelluläre Protein β -Catenin ein (Clevers 2006). Durch Bindung des Wnt-Liganden an seinen Rezeptor reichert sich β -Catenin im Zellkern und im Zytoplasma an und kann im Zellkern an Transkriptionsfaktoren binden, wodurch die Transkription bestimmter Wnt-Zielgene aktiviert

wird (Clevers 2006, MacDonald *et al.* 2009). Untersuchungen von Hsu *et al.* ergaben, dass der Wnt10A-Ligand in Nierenkarzinomzelllinien hochreguliert ist (Hsu *et al.* 2012). Die Überexpression von Wnt10A und β -Catenin im NZK hat eine erhöhte Zellproliferation, Zellinvasion, Zellmigration und eine erhöhte Chemosensitivität zur Folge (Hsu *et al.* 2012). Hagos *et al.* konnten eine hohe Expression von β -Catenin im Zytoplasma, in der Zellmembran und im Zellkern von RCCNG1-Zellen nachweisen (Hagos *et al.* 2014). In Anlehnung an dieses Erkenntnis wäre es denkbar, dass eine Herunterregulierung des β -Catenins und/oder des Wnt10A-Liganden zu einer erhöhten Chemosensitivität der RCCNG1-Zellen führen könnte. Pal *et al.* konnten erstmals nachweisen, dass spezifische Telomer-Bindungsfaktoren und deren Inhibition durch siRNA (*small interfering RNA*) als Angriffspunkte zur Therapie des Nierenkarzinoms dienen könnten (Pal *et al.* 2015). Telomere sind spezifische DNA-Sequenzen am Ende der Chromosomen, die keine kodierende Information besitzen und für den Schutz der Chromosomen unverzichtbar sind (Armanios und Blackburn 2012). Die Telomere selbst werden durch spezifische Bindungsproteine geschützt, die dem sogenannten Shelterin-Komplex angehören (De Lange 2005). Zwei dieser Bindungsproteine sind die von Pal *et al.* untersuchten *telomeric repeat binding factors* TRF1 und TRF2 (De Lange 2005). In ihren Untersuchungen konnte in Nierenkarzinomzelllinien eine erhöhte Expression von TRF1 und TRF2 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene im Vergleich zum gesunden Nierenparenchym beobachtet werden (Pal *et al.* 2015). Somit stellten Pal *et al.* die Hypothese auf, dass diese Hochregulation ein genereller Mechanismus von Nierenkarzinomzellen sein könnte. Weiterhin wurde festgestellt, dass der Einsatz von siRNA die Expression von TRF1 und TRF2 in der Nierenkarzinomzelllinie A498 unterdrückt. Diese experimentelle Stilllegung der Bindungsproteine hatte Auswirkungen auf den Zellzyklus („Zellzyklus-Arrest“), verminderte die Zellproliferation und induzierte 96 Stunden nach der Behandlung mit siRNA eine erhöhte Apoptoserate in der Nierenkarzinomzelllinie im Vergleich sowohl zu unbehandelten Zellen als auch zu Kontrollzellen *in-vitro* (Pal *et al.* 2015). Die präsentierten Ergebnisse dieser Publikation führen zu der Annahme, dass die siRNA von Telomer-Bindungsproteinen effektive Substanzen zur Behandlung des Nierenzellkarzinoms darstellen könnten, möglicherweise auch im Hinblick auf die Chemosensitivität.

5. Zusammenfassung

Das Nierenzellkarzinom stellt mit 86 % den häufigsten bösartigen Tumor der Nieren dar. Viele Patienten mit Nierenzellkarzinom weisen bereits bei der Diagnosestellung Metastasen auf. Die Therapiemöglichkeiten zur Behandlung des Nierenzellkarzinoms sind bis heute limitiert. Aus diesem Grund ist die Etablierung neuer Behandlungsmöglichkeiten unumgänglich. Ich habe mit dieser Studie versucht, einen Beitrag zur Verbesserung der Chemotherapie des Nierenzellkarzinoms zu leisten, indem ich mögliche Beeinflussungsmöglichkeiten der Expression von Zytostatika-Transportern des Nephrons zur zielgerichteten Chemotherapie untersucht habe. Eine klare Aussage, die von dieser Arbeit abgeleitet werden kann, ist, dass der untersuchte Transkriptionsfaktor BCL6 keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von Transportproteinen in den Nierenkarzinomzelllinien 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1 ausübt und auch daraus resultierend die Chemosensitivität dieser Nierenkarzinomzelllinien nicht erhöht. Entgegen den Erwartungen konnte in der Nierenkarzinomzelllinie ACHN ein geringfügiger negativer Einfluss von BCL6 auf die OCT1-Expression nachgewiesen werden. Die immunhistochemische Analyse lieferte den Nachweis, dass die Nierenkarzinomzelllinien 786-O, ACHN und LN78 den Transkriptionsfaktor BCL6 nicht als Protein exprimieren. Die Behandlung der RCCNG1-Zellen mit den Zytostatika 5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin führte nicht zur gewünschten Apoptoserate und konnte durch BCL6 nicht beeinflusst werden. Da die Expression der untersuchten Transportproteine zwischen den Nierenkarzinomzelllinien verschiedener Patienten variiert, sollte die Chemotherapie der Patienten individuell auf deren Transporter-Expression abgestimmt werden.

6. Anhang

6.1. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| ABC | ATP- <i>binding cassette</i> |
| ACE | <i>angiotensin converting enzyme</i> |
| α | Alpha |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| ANOVA | <i>analysis of variance</i> |
| BCL6 | B-cell lymphoma 6 |
| β | Beta |
| β -ME | β -Mercaptoethanol |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| BTB/POZ | Bric à Brac/Tramtrack/Broad complex/POX Virus Zink-Finger |
| ca. | circa |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> |
| CNT3 | konzentrativer Nukleosid-Transporter 3 (<i>concentrative nucleoside transporter 3</i>) |
| CT | <i>cycle of threshold</i> |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-Phenylindol |
| Δ | Delta |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>) |
| dNTPs | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ENT | equilibrativer Nukleosid-Transporter (<i>equilibrative nucleoside transporter</i>) |
| FAM | Carboxy-Fluorescein |
| FCS | <i>fetal calf serum</i> |
| FRET | Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer |
| 5-FdUMP | 5-Fluorodeoxyurinmonophosphat |
| 5-FdUTP | 5-Fluorodeoxyuridintriphosphat |
| 5-FU | 5-Fluorouracil |
| 5-FUDR | 5-Fluorodeoxyuridin |
| 5-FUTP | Fluorouridintriphosphat |

| | |
|------------------|---|
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| HG | <i>high glucose</i> |
| HNF | <i>hepatocyte nuclear factor</i> |
| H ₂ O | Wasser |
| MATE | <i>multidrug and toxin extrusion</i> |
| MDR1 | <i>Multidrug-Resistance-Protein 1</i> |
| mRNA | <i>messenger RNA (Boten-RNA)</i> |
| miRNA | mikroRNA |
| MRP2 | <i>Multidrug-Resistance-associated-Protein 2</i> |
| n | Anzahl (<i>number</i>) |
| n.s. | nicht signifikant |
| n.u. | nicht untersucht |
| NZK | Nierenzellkarzinom |
| OAT | Organische-Anionen-Transporter |
| OCT | Organische-Kationen-Transporter |
| OCTN | Organische-Kationen/Carnitin-Transporter |
| Oligo-dT | Oligo-Desoxythymidin |
| PAH | <i>para</i> -Aminohippursäure |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>) |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| RNA | Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>) |
| rRNA | ribosomale RNA |
| RNase | Ribonuklease |
| SEM | <i>standard error of the mean</i> |
| siRNA | <i>small interfering RNA</i> |
| SLC | <i>solute carrier</i> |
| SN38 | 7-Ethyl-10-Hydroxy-Camptothecin, aktiver Metabolit von Irinotecan |
| Tab. | Tabelle |
| TAMRA | 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin |
| TBE | Tris-Borat-EDTA-Puffer |
| TRF | <i>telomeric repeat binding factor</i> |
| Tris | Trishydroxymethylaminomethan |
| tRNA | Transfer-RNA |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| UV | ultraviolett |

6.2. Einheiten

| | | | |
|-----|--------------------|-----|--|
| bp | Basenpaar | M | Molarität |
| °C | Grad Celsius | μ | Mikro |
| g | Fallbeschleunigung | n | Nano |
| g | Gramm | p | Pico |
| kb | Kilobasenpaar | sek | Sekunden |
| kDa | Kilodalton | U | <i>unit</i> (Einheit der Enzymaktivität) |
| l | Liter | V | Volt |
| m | Milli | w/v | Masse pro Volumen (<i>weight per volume</i>) |
| min | Minute | | |

6.3. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1.1: Das Nephron..... | 1 |
| Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des BCL6-Proteins..... | 10 |
| Abbildung 1.3: Die Chemoresistenz der Nierenkarzinomzellen könnte durch gesteigerte Expression der SLC22-Transporter überwunden werden. | 12 |
| Abbildung 3.1: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zelllinien (A) 786-O, (B) ACHN, (C) LN78, (D) RCCNG1..... | 31 |
| Abbildung 3.2: Nachweis des BCL6-Gens in der Zelllinie 786-O. | 32 |
| Abbildung 3.3: Nachweis des BCL6-Gens in der Zelllinie ACHN. | 33 |
| Abbildung 3.4: Nachweis des BCL6-Gens in der Zelllinie LN78..... | 33 |
| Abbildung 3.5: Nachweis des BCL6-Gens in der Zelllinie RCCNG1. | 34 |
| Abbildung 3.6: GAPDH-Expression in den Zelllinien 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1 unter Einfluss der BCL6-Überexpression..... | 35 |
| Abbildung 3.7: Beeinflussung der Expression von OATs und OCT1 durch BCL6-Überexpression in der Nierenkarzinomzelllinie 786-O. | 36 |
| Abbildung 3.8: Beeinflussung der Expression von OAT10 und OCT1 durch BCL6-Überexpression in der Nierenkarzinomzelllinie ACHN. | 37 |
| Abbildung 3.9: Beeinflussung der Expression von OATs und OCT1 durch BCL6-Überexpression in der Nierenkarzinomzelllinie LN78..... | 38 |
| Abbildung 3.10: Beeinflussung der Expression von OATs, OATs, OCTs MRP2 und MDR1 durch BCL6-Überexpression in der Nierenkarzinomzelllinie RCCNG1. | 39 |
| Abbildung 3.11: BCL6-Expression in RCCNG1-Zellen. Immunhistochemische Färbung. | 41 |
| Abbildung 3.12: Immunfluoreszenz-Nachweis von BCL6 in 786-O, ACHN, LN78 und RCCNG1..... | 42 |
| Abbildung 3.13: Caspaseaktivität nach Inkubation mit 5-FU..... | 43 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 3.14: Caspaseaktivität nach Inkubation mit Irinotecan. | 44 |
| Abbildung 3.15: Caspaseaktivität nach Inkubation mit Oxaliplatin. | 45 |

6.4. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 2.1: Geräte..... | 13 |
| Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterial..... | 14 |
| Tabelle 2.3: Verwendete Chemikalien | 15 |
| Tabelle 2.4: Lösungen und Puffer..... | 15 |
| Tabelle 2.5: Zellkulturmedien..... | 16 |
| Tabelle 2.6: Kits und Enzyme | 16 |
| Tabelle 2.7: Antikörper | 17 |
| Tabelle 2.8: Vektoren | 17 |
| Tabelle 2.9: Oligonukleotidprimer | 17 |
| Tabelle 2.10: Übersicht über die verwendeten TaqMan® Assays mit ihren Spleißvarianten | 18 |
| Tabelle 2.11: Software..... | 19 |
| Tabelle 2.12: Online-Datenbanken | 19 |
| Tabelle 2.13: Temperaturvorgaben Schritt 1: Denaturierung der RNA..... | 24 |
| Tabelle 2.14: Zusammensetzung des Mastermixes für die cDNA-Synthese | 24 |
| Tabelle 2.15: cDNA-Synthese mit Superscript®II | 24 |
| Tabelle 2.16: Mastermix-Zusammensetzung für die Standard-PCR | 25 |
| Tabelle 2.17: Thermocycler-Programm für die Standard-PCR..... | 25 |
| Tabelle 2.18: Reaktionsansatz der TaqMan® real-time PCR..... | 27 |
| Tabelle 2.19: Bedingungen der TaqMan® real-time PCR..... | 27 |
| Tabelle 3.1: Tabellarische Zusammenfassung der real-time PCR-Analyse..... | 40 |
| Tabelle 4.1: Mögliche Zytostatika-Transporter der SLC- und ABC-Familie | 48 |

7. Literaturverzeichnis

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P:

Molekularbiologie der Zelle.

5. Auflage;

Übersetzung hrsg. v. Schäfer U.

Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2011

Alebouyeh M, Takeda M, Onozato ML, Tojo A, Noshiro R, Hasannejad H, Inatomi J, Narikawa S, Huang XL, Khamdang S, Anzai N, Endou H (2003):

Expression of human organic anion transporters in the choroid plexus and their interactions with neurotransmitter metabolites.

J Pharmacol Sci 93, 430-436

Altieri P, Spallarossa P, Barisione C, Garibaldi S, Garuti A, Fabbi P, Ghigliotti G, Brunelli C (2012):

Inhibition of doxorubicin-induced senescence by PPAR δ activation agonists in cardiac muscle cells: cooperation between PPAR δ and Bcl6.

PLoS One 7, e46126

Armanios M, Blackburn EH (2012):

The telomere syndromes.

Nat Rev 13, 693-704

Bahn A, Hagos Y, Reuter S, Balen D, Brzica H, Krick W, Burckhardt BC, Sabolic I, Burckhardt G (2008):

Identification of a new urate and high affinity nicotinate transporter, hOAT10 (SLC22A13).

J Biol Chem 283, 16332-16341

Basso K, Dalla-Favera R (2012):

Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells.

Immunol Rev 247, 172-183

Bereshchenko OR, Gu W, Dalla-Favera R (2002):

Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6.

Nat Genet 32, 606-613

Beretta GL, Benedetti V, Cossa G, Assaraf YG, Bram E, Gatti L, Corna E, Carenini N, Colangelo D, Howell SB, Zunino F, Perego P (2010):

Increased levels and defective glycosylation of MRPs in ovarian carcinoma cells resistant to oxaliplatin.

Biochem Pharmacol 79, 1108-1117

Bergeron MJ, Simonin A, Bürzle M, Hediger MA (2008):

Inherited epithelial transporter disorders--an overview.

J Inherit Metab Dis 31, 178-187

Bleasby K, Chauhan S, Brown CD (2000):

Characterization of MPP⁺ secretion across human intestinal Caco-2 cell monolayers: role of P-glycoprotein and a novel Na⁽⁺⁾-dependent organic cation transport mechanism.

Br J Pharmacol 129, 619-625

Bradford MM (1976):

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal Biochem 72, 248-254

Burckhardt BC, Burckhardt G (2003):

Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubule cells.

Rev Physiol Biochem Pharmacol 146, 95-158

Burckhardt G (2012):

Drug transport by Organic Anion Transporters (OATs).

Pharmacol Ther 136, 106-130

Burckhardt G, Wolff NA (2000):

Structure of renal organic anion and cation transporters.

Am J Physiol Renal Physiol 278, F853-866

Burckhardt G, Burckhardt BC (2011):

In Vitro and In Vivo Evidence of the Importance of Organic Anion Transporters (OATs) in Drug Therapy.

Handb Exp Pharmacol 201, 29-104

Burger H, Zoumaro-Djayoon A, Boersma AW, Helleman J, Berns EM, Mathijssen RH, Loos WJ, Wiemer EA (2010):

Differential transport of platinum compounds by the human organic cation transporter hOCT2 (hSLC22A2).

Br J Pharmacol 159, 898-908

Campbell NA, Reece JB:

Biologie.

6., überarbeitete Auflage;

Pearson Education Deutschland, München 2006

964

Cha SH, Sekine T, Kusuhara H, Yu E, Kim JY, Kim DK, Sugiyama Y, Kanai Y, Endou H (2000):

Molecular cloning and characterization of multispecific organic anion transporter 4 expressed in the placenta.

J Biol Chem 275, 4507-4512

Cha SH, Sekine T, Fukushima JI, Kanai Y, Kobayashi Y, Goya T, Endou H (2001):

Identification and characterization of human organic anion transporter 3 expressing predominantly in the kidney.

Mol Pharmacol 59, 1277-1286

Chang CC, Ye BH, Chaganti RS and Dalla-Favera R (1996):

BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor.
Proc Natl Acad Sci U S A 93, 6947-6952

Chen Y, Zhang S, Sorani M, Giacomini KM (2007):

Transport of paraquat by human organic cation transporters and multidrug and toxic compound extrusion family.
J Pharmacol Exp Ther 322, 695-700

Chen Y, Li S, Brown C, Cheatham S, Castro RA, Leabman MK, Urban TJ, Chen L, Yee SW, Choi JH, Huang Y, Brett CM, Burchard EG, Giacomini KM (2009):

Effect of genetic variation in the organic cation transporter 2 on the renal elimination of metformin.
Pharmacogenet Genomics 19, 497-504

Chen ZS, Tiwari AK (2011):

Multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs) in cancer chemotherapy and genetic diseases.
FEBS J 278, 3226-3245

Chomczynski P, Sacchi N (1987):

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.
Anal Biochem 162, 156-159

Ciarimboli G, Ludwig T, Lang D, Pavenstädt H, Koepsell H, Piechota HJ, Haier J, Jaehde U, Zisowsky J, Schlatter E (2005):

Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2.
Am J Pathol 167, 1477-1484

Ciarimboli G, Holle SK, Vollenbröcker B, Hagos Y, Reuter S, Burckhardt G, Bierer S, Herrmann E, Pavenstädt H, Rossi R, Kleta R, Schlatter E (2011):

New clues for nephrotoxicity induced by ifosfamide: preferential renal uptake via the human organic cation transporter 2.
Mol Pharm 8, 270-279

Clevers H (2006):

Wnt/beta-catenin signaling in development and disease.
Cell 127, 469-480

Costoya JA (2007):

Functional analysis of the role of POK transcriptional repressors.
Brief Funct Genomic Proteomic 6, 8-18

Cui Y, König J, Buchholz JK, Spring H, Leier I, Keppler D (1999):

Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells.
Mol Pharmacol 55, 929-937

De Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G, Papamichael D, Le Bail N, Louvet C, Hendler D, de Braud F, Wilson C, Morvan F, Bonetti A (2000):

Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer.

J Clin Oncol 18, 2938-2947

De Lange T (2005):

Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres.

Genes Dev 19, 2100-2110

Dean M, Allikmets R (1995):

Evolution of ATP-binding cassette transporter genes.

Curr Opin Genet Dev 5, 779-785

Dempke W:

Lehrbuch Hämato-Onkologie.

1. Auflage;

Verlag Hans Huber, Hogrefe **2006**

269 – 276

Dent AL, Vasanwala FH, Toney LM (2002):

Regulation of gene expression by proto-oncogene BCL-6.

Crit Rev Oncol Hematol 41, 1-9

Dutcher J (2002):

Current status of interleukin-2 therapy for metastatic renal cell carcinoma and metastatic melanoma.

Oncology 16, 4-10

Ekaratanawong S, Anzai N, Jutabha P, Miyazaki H, Noshiro R, Takeda M, Kanai Y, Sophasan S, Endou H (2004):

Human organic anion transporter 4 is a renal apical organic anion/dicarboxylate exchanger in the proximal tubules.

J Pharmacol Sci 94, 297-304

Emami Riedmaier A, Nies AT, Schaeffeler E, Schwab M (2012):

Organic anion transporters and their implications in pharmacotherapy.

Pharmacol Rev 64, 421-449

Foley FB, Mulvaney WP, Richardson EJ, Victor I (1952):

Radical nephrectomy for neoplasms.

J Urol 68, 39-49

Fulton DL, Sundararajan S, Badis G, Hughes TR, Wasserman WW, Roach JC, Sladek R (2009):

TFCat: the curated catalog of mouse and human transcription factors.

Genome Biol 10, R29

Gebrosky NP, Koukol S, Nseyo UO, Carpenter C, Lamm DL (1997):

Treatment of renal cell carcinoma with 5-fluorouracil and alfa-interferon.
Urology 50, 863-867

George CM, Vogelzang NJ, Rini BI, Geoffroy FJ, Kollipara P, Stadler WM (2002):

A phase II trial of weekly intravenous gemcitabine and cisplatin with continuous infusion fluorouracil in patients with metastatic renal cell carcinoma.
Ann Oncol 13, 116-120

Gerk PM, Vore M (2002):

Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition.
J Pharmacol Exp Ther 302, 407-415

Gorboulev V, Ulzheimer JC, Akhoundova A, Ulzheimer-Teuber I, Karbach U, Quester S, Baumann C, Lang F, Busch AE, Koepsell H (1997):

Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters.
DNA Cell Biol 16, 871-881

Goyal R, Gersbach E, Yang XJ, Rohan SM (2013):

Differential diagnosis of renal tumors with clear cytoplasm: clinical relevance of renal tumor subclassification in the era of targeted therapies and personalized medicine.
Arch Pathol Lab Med 137, 467-480

Grottker J, Rosenberger A, Burckhardt G, Hagos Y (2011):

Interaction of human multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1) transporter with antineoplastic agents.
Drug Metabol Drug Interact 26, 181-189

Gupta S, Burckhardt G, Hagos Y (2011a):

SLC22 transporter family proteins as targets for cytostatic uptake into tumor cells.
Biol Chem 392, 117-124

Gupta S, Wulf G, Henjakovic M, Koepsell H, Burckhardt G, Hagos Y (2011b).

Human organic cation transporter 1 is expressed in lymphoma cells and increases susceptibility to irinotecan and paclitaxel.
J Pharmacol Exp Ther 341, 16-23

Hagos Y, Stein D, Ugele B, Burckhardt G, Bahn A (2007):

Human renal organic anion transporter 4 operates as an asymmetric urate transporter.
J Am Soc Nephrol 18, 430-439

Hagos Y, Wegner W, Kuehne A, Floerl S, Marada VV, Burckhardt G, Henjakovic M (2014):

HNF4 α induced chemosensitivity to oxaliplatin and 5-FU mediated by OCT1 and CNT3 in renal cell carcinoma.
J Pharm Sci 103, 3326-3334

Hautmann RE, Huland H:

Urologie.

2., vollständig überarbeitete Auflage;

Springer-Verlag, Berlin 2001

Hayer-Zillgen M, Brüss M, Bönisch H (2002):

Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3.

Br J Pharmacol 136, 829-836

Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, Mooren D, Griesbach L, Duschinsky R, Schnitzer RJ, Plevin E, Scheiner J (1957):

Fluorinated pyrimidines, a new class of tumor-inhibitory compounds.

Nature 197, 663-666

Heise M, Lautem A, Knapstein J, Schattenberg JM, Hoppe-Lotichius M, Foltys D, Weiler N, Zimmermann A, Schad A, Grundemann D, Otto G, Galle PR, Schuchmann M, Zimmermann T (2012):

Downregulation of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) in human hepatocellular carcinoma and their prognostic significance.

BMC Cancer 12, 109

Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A, Artursson P, Ungell AL, Karlsson J (2007):

Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines.

Drug Metab Dispos 35, 1333-1340

Hoffmann U, Kroemer HK (2004):

The ABC Transporters MDR1 and MRP2: Multiple Functions in Disposition of Xenobiotics and Drug Resistance.

Drug Metab Rev 36, 669-701

Hosoyamada M, Sekine T, Kanai Y, Endou H (1999):

Molecular cloning and functional expression of a multispecific organic anion transporter from human kidney.

Am J Physiol 276, F122-128

Hsu RJ, Ho JY, Cha TL, Yu DS, Wu CL, Huang WP, Chu P, Chen YH, Chen JT, Yu CP (2012):

WNT10A plays an oncogenic role in renal cell carcinoma by activating WNT/beta-catenin pathway.

PLoS One 7, e47649

Huang Y (2007):

Pharmacogenetics/genomics of membrane transporters in cancer chemotherapy.

Cancer and Metastasis Reviews 26, 183-201

Huls M, Russel FG, Masereeuw R (2009):

The role of ATP binding cassette transporters in tissue defense and organ regeneration.
J Pharmacol Exp Ther 328, 3-9

Ikehata M, Ueda K, Iwakawa S (2012):

Different involvement of DNA methylation and histone deacetylation in the expression of solute-carrier transporters in 4 colon cancer cell lines.
Biol Pharm Bull 35, 301-307

Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM (2005):

MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer.
Cancer Res 65, 7065-7070

Jacobsson JA, Haitina T, Lindblom J, Fredriksson R (2007):

Identification of six putative human transporters with structural similarity to the drug transporter SLC22 family.
Genomics 90, 595-609

Jin L, Kikuchi R, Saji T, Kusuhara H, Sugiyama Y (2012):

Regulation of tissue-specific expression of renal organic anion transporters by hepatocyte nuclear factor 1 α/β and DNA methylation.
J Pharmacol Exp Ther 340, 648-655

Jong NN, Nakanishi T, Liu JJ, Tamai I, McKeage MJ (2011):

Oxaliplatin transport mediated by organic cation/carnitine transporters OCTN1 and OCTN2 in overexpressing human embryonic kidney 293 cells and rat dorsal root ganglion neurons.
J Pharmacol Exp Ther 338, 537-547

Jonker JW, Schinkel AH (2004):

Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3.
J Pharmacol Exp Ther 308, 2-9

Kikuchi R, Kusuhara H, Hattori N, Shiota K, Kim I, Gonzalez FJ, Sugiyama Y (2006):

Regulation of the expression of human organic anion transporter 3 by hepatocyte nuclear factor 1 α/β and DNA methylation.
Mol Pharmacol 70, 887-896

Kim DH, Park JY, Sohn SK, Lee NY, Baek JH, Jeon SB, Kim JG, Suh JS, Do YR, Lee KB (2006):

Multidrug resistance-1 gene polymorphisms associated with treatment outcomes in de novo acute myeloid leukemia.
Int J Cancer 118, 2195-2201

Kitada N, Takara K, Minegaki T, Itoh C, Tsujimoto M, Sakaeda T, Yokoyama T (2008):
Factors affecting sensitivity to antitumor platinum derivatives of human colorectal tumor cell lines.

Cancer Chemother Pharmacol 62, 577-584

Klinke R, Pape HC, Silbernagl S:

Physiologie.

6. Auflage;

Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2010

Kobayashi Y, Ohshiro N, Tsuchiya A, Kohyama N, Ohbayashi M, Yamamoto T (2004):

Renal transport of organic compounds mediated by mouse organic anion transporter 3 (mOat3): further substrate specificity of mOat3.

Drug Metab Dispos 32, 479-483

Kobayashi Y, Ohshiro N, Sakai R, Ohbayashi M, Kohyama N, Yamamoto T (2005):

Transport mechanism and substrate specificity of human organic anion transporter 2 (hOat2 [SLC22A7]).

J Pharm Pharmacol 57, 573-578

Koepsell H, Endou H (2004):

The SLC22 drug transporter family.

Pflugers Arch 447, 666-676

Koepsell H, Schmitt, BM, Gorboulev V (2003):

Organic cation transporters.

Rev Physiol Biochem Pharmacol 150, 36-90

Koepsell H, Lips K, Volk C (2007):

Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications.

Pharm Res 24, 1227-1251

Kojima S, Hatano M, Okada S, Fukuda T, Toyama Y, Yuasa S, Ito H, Tokuhisa T (2001):

Testicular germ cell apoptosis in Bcl6-deficient mice.

Development 128, 57-65

Koul H, Huh JS, Rove KO, Crompton L, Koul S, Meacham RB, Kim FJ (2011):

Molecular aspects of renal cell carcinoma: a review.

Am J Cancer Res 1, 240-254

Kusuhara H, Sugiyama Y (2009):

In vitro-in vivo extrapolation of transporter-mediated clearance in the liver and kidney. Drug Metab Pharmacokinet 24, 37-52

Lee MA, Byun JH, Shim BY, Woo IS, Kang JH, Hong YS, Lee KS, Choi MG, Chang SK, Oh ST, Choi SI, Lee DS (2005):

Irinotecan, continuous 5-fluorouracil, and low dose of leucovorin (modified FOLFIRI) as first line of therapy in recurrent or metastatic colorectal cancer.

Korean J Intern Med 20, 205-209

Lemercier C, Brocard MP, Puvion-Dutilleul F, Kao HY, Albagli O, Khochbin S (2002):

Class II histone deacetylases are directly recruited by BCL6 transcriptional repressor.

J Biol Chem 277, 22045-22052

Liu L, White MJ, MacRae TH (1999):

Transcription factors and their genes in higher plants functional domains, evolution and regulation.

Eur J Biochem 262, 247-257

Ljungberg B, Campbell SC, Choi HY, Jacqmin D, Lee JE, Weikert S, Kiemeny LA (2011):

The epidemiology of renal cell carcinoma.

Eur Urol 60, 615–621

Löffler G, Petrides PE:

Biochemie & Pathobiochemie.

9. Auflage;

Springer-Verlag, Berlin 2014

Longo R, D'Andrea MR, Sarmiento R, Salerno F, Gasparini G (2007):

Integrated therapy of kidney cancer.

Ann Oncol 18, vi141-148

Lovejoy KS, Todd RC, Zhang S, McCormick MS, D'Aquino JA, Reardon JT, Sancar A, Giacomini KM, Lippard SJ (2008):

cis-Diammine(pyridine)chloroplatinum(II), a monofunctional platinum(II) antitumor agent: Uptake, structure, function, and prospects.

Proc Natl Acad Sci USA 105, 8902-8907

MacDonald BT, Tamai K, He X (2009):

Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases.

Dev Cell 17, 9-26

Marada VVVR:

Interaction of hepatic uptake transporters with antineoplastic compounds and regulation of the expression of organic cation transporter 3 in renal carcinoma cells.

Naturwiss. Diss. Göttingen 2014

Martel CL, Lara PN (2003):

Renal cell carcinoma: current status and future directions.

Crit Rev Oncol Hematol 45, 177-190

Masereeuw R, Russel FGM (2012):

Regulatory Pathways for ATP-binding Cassette Transport Proteins in Kidney Proximal Tubules.

The AAPS Journal 14, 883-894

Masuda S, Terada T, Yonezawa A, Tanihara Y, Kishimoto K, Katsura T, Ogawa O, Inui K (2006):

Identification and functional characterization of a new human kidney-specific H⁺/organic cation antiporter, kidney-specific multidrug and toxin extrusion 2.

J Am Soc Nephrol 17, 2127-2135

Miles RR, Crockett DK, Lim MS, Elenitoba-Johnson KS (2005):

Analysis of BCL6-interacting proteins by tandem mass spectrometry.

Mol Cell Proteomics 4, 1898-1909

Minematsu T, Giacomini KM (2011):

Interactions of tyrosine kinase inhibitors with organic cation transporters and multidrug and toxic compound extrusion proteins.

Mol Cancer Ther 10, 531-539

Motohashi H, Sakurai Y, Saito H, Masuda S, Urakami Y, Goto M, Fukatsu A, Ogawa O, Inui K (2002):

Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney.

J Am Soc Nephrol 13, 866-874

Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM (1996):

Renal-Cell Carcinoma.

N Engl J Med 335, 865-875

Mülhardt C:

Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics.

6. Auflage;

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2009

Nishimura M, Naito S (2005):

Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATPbinding cassette and solute carrier transporter families.

Drug Metab Pharmacokinet 20, 452-477

Nomura M, Matsunami T, Kobayashi K, Uchibayashi T, Koshida K, Tanaka M, Namiki M, Mizuhara Y, Akiba T, Yokogawa K, Moritani S, Miyamoto K (2005):

Involvement of ABC transporters in chemosensitivity of human renal cell carcinoma, and regulation of MRP2 expression by conjugated bilirubin.

Anticancer Res 25, 2729-2735

Ogasawara K, Terada T, Asaka J, Katsura T, Inui K (2006):

Human organic anion transporter 3 gene is regulated constitutively and inducibly via a cAMP-response element.

J Pharmacol Exp Ther 319, 317-322

Otsuka M, Matsumoto T, Morimoto R, Arioka S, Omote H, Moriyama Y (2005):

A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations.

Proc Natl Acad Sci U S A 102, 17923-17928

Pal D, Sharma U, Singh SK, Kakkar N, Prasad R (2015):

Over-Expression of Telomere Binding Factors (TRF1 & TRF2) in Renal Cell Carcinoma and Their Inhibition by Using SiRNA Induce Apoptosis, Reduce Cell Proliferation and Migration In vitro.

PLoS One 10, e0115651

Pfaffl MW (2004):

Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung.

Biospektrum 1, 92-95

Pratt S, Shepard RL, Kandasamy RA, Johnston PA, Perry W 3rd, Dantzig AH (2005):

The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites.

Mol Cancer Ther 4, 855-863

Pullen TJ, da Silva Xavier G, Kelsey G, Rutter GA (2011):

miR-29a and miR-29b contribute to pancreatic beta-cell-specific silencing of monocarboxylate transporter 1 (Mct1).

Mol Cell Biol 31, 3182-3194

Ramesh M, Ahlawat P, Srinivas NR (2010):

Irinotecan and its active metabolite, SN-38: review of bioanalytical methods and recent update from clinical pharmacology perspectives.

Biomed Chromatogr 24, 104-123

Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E (2002):

Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin.

Mol Cancer Ther 1, 227-235

Rivory LP, Bowles MR, Robert J, Pond SM (1996):

Conversion of irinotecan (CPT-11) to its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), by human liver carboxylesterase.

Biochem Pharmacol 52, 1103-1111

Rizwan AN, Burckhardt G (2007):

Organic anion transporters of the SLC22 family: biopharmaceutical, physiological, and pathological roles.

Pharm Res 24, 450-470

Rothenberg ML (1997):

Topoisomerase I inhibitors: review and update.
Ann Oncol 8, 837-855

Rothenberg ML (2000):

Efficacy of oxaliplatin in the treatment of colorectal cancer.
Oncology 14, 9-14

Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, Jones PA (2006):

Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells.
Cancer Cell 9, 435-443

Saji T, Kikuchi R, Kusuhara H, Kim I, Gonzalez FJ, Sugiyama Y (2008):

Transcriptional regulation of human and mouse organic anion transporter 1 by hepatocyte nuclear factor 1 alpha/beta.
J Pharmacol Exp Ther 324, 784-790

Sakurai Y, Motohashi H, Ueo H, Masuda S, Saito H, Okuda M, Mori N, Matsuura M, Doi T, Fukatsu A, Ogawa O, Inui K (2004):

Expression levels of renal organic anion transporters (OATs) and their correlation with anionic drug excretion in patients with renal diseases.
Pharm Res 21, 61-67

Sata R, Ohtani H, Tsujimoto M, Murakami H, Koyabu N, Nakamura T, Uchiumi T, Kuwano M, Nagata H, Tsukimori K, Nakano H, Sawada Y (2005):

Functional analysis of organic cation transporter 3 expressed in human placenta.
J Pharmacol Exp Ther 315, 888-895

Schaub TP, Kartenbeck J, König J, Spring H, Dörsam J, Staehler G, Störkel S, Thon WF, Keppler D (1999):

Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma.
J Am Soc Nephrol 10, 1159-1169

Schilsky RL (1998):

Biochemical and clinical pharmacology of 5-fluorouracil.
Oncology 12, 13-8

Schmidt R, Lang F, Heckmann M:

Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie.
31. Auflage;
Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2010

Sekine T, Watanabe N, Hosoyamada M, Kanai Y, Endou H (1997):

Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter.
J Biol Chem 272, 18526 – 18529

Sekine T, Miyazaki H, Endou H (2006):

Molecular physiology of renal organic anion transporters.
Am J Physiol Renal Physiol 290, F251-F261

Sharom FJ (2008):

ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance.
Pharmacogenomics 9, 105-127

Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM (2012):

Cisplatin Resistance: A Cellular Self-Defense Mechanism Resulting from Multiple Epigenetic and Genetic Changes.
Pharmacol Rev 64, 706–721

Shnitsar V:

The expression of polyspecific transporters in renal tumors and their role in chemotherapeutical treatment.
Naturwiss. Diss. Göttingen **2008**

Shnitsar V, Eckardt R, Gupta S, Grottker J, Müller GA, Koepsell H, Burckhardt G, Hagos Y (2009):

Expression of human organic cation transporter 3 in kidney carcinoma cell lines increases chemosensitivity to melphalan, irinotecan, and vincristine.
Cancer Res 69, 1494-1501

Silbernagl S, Despopoulos A:

Taschenatlas Physiologie.
8. Auflage;
Georg Thieme Verlag, Stuttgart **2012**

Soini Y, Järvinen K, Kaarteenaho-Wiik R, Kinnula V (2001):

The expression of P-glycoprotein and multidrug resistance proteins 1 and 2 (MRP1 and MRP2) in human malignant mesothelioma.
Ann Oncol 12, 1239-1245

Stadler WM, Halabi S, Rini B, Ernstoff MS, Davila E, Picus J, Barrier R, Small EJ; Cancer and Leukemia Group B (2006):

A phase II study of gemcitabine and capecitabine in metastatic renal cancer: a report of Cancer and Leukemia Group B protocol 90008.
Cancer 107, 1273-1279

Staudt LM, Dent AL, Shaffer AL, Yu X (1999):

Regulation of lymphocyte cell fate decisions and lymphomagenesis by BCL-6.
Int Rev Immunol 18, 381-403

Sültmann H, von Heydebreck A, Huber W, Kuner R, Bunness A, Vogt M, Gunawan B, Vingron M, Fúzesi L, Poustka A (2005):

Gene expression in kidney cancer is associated with cytogenetic abnormalities, metastasis formation, and patient survival.
Clin Cancer Res 11, 646-655

Takeda M, Khamdang S, Narikawa S, Kimura H, Hosoyamada M, Cha SH, Sekine T, Endou H (2002):

Characterization of methotrexate transport and its drug interactions with human organic anion transporters.

J Pharmacol Exp Ther 302, 666-671

Tanihara Y, Masuda S, Sato T, Katsura T, Ogawa O, Inui K (2007):

Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H⁺-organic cation antiporters.

Biochem Pharmacol 74, 359–371

Todd RC, Lippard SJ (2009):

Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds.

Metallomics 1, 280-291

Toffoli G, Cecchin E, Corona G, Boiocchi M (2003):

Pharmacogenetics of irinotecan.

Curr Med Chem Anticancer Agents 3, 225-237

Valinezhad Orang A, Safaralizadeh R, Kazemzadeh-Bavili M (2014):

Mechanisms of miRNAMediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation.

Int J Genomics 2014, 970607

Van Cutsem E, Nordlinger B, Cervantes A; ESMO Guidelines Working Group (2010):

Advanced colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for treatment.

Ann Oncol 21, v93-97

Waalder J, Machon O, von Kries JP, Wilson SR, Lundenes E, Wedlich D, Gradl D, Paulsen JE, Machonova O, Dembinski JL, Dinh H, Krauss S (2011):

Novel synthetic antagonists of canonical Wnt signaling inhibit colorectal cancer cell growth.

Cancer Res 71, 197-205

Wagner SD, Ahearne M, Ferrigno PK (2011):

The role of BCL6 in lymphomas and routes to therapy.

British Journal of Haematology 152, 3-12

Walsh N, Larkin A, Kennedy S, Connolly L, Ballot J, Ooi W, Gullo G, Crown J, Clynes M, O'Driscoll L (2009):

Expression of multidrug resistance markers ABCB1 (MDR-1/P-gp) and ABCC1 (MRP-1) in renal cell carcinoma.

BMC Urol 9, 6

Watanabe S, Tsuda M, Terada T, Katsura T, Inui K (2010):

Reduced renal clearance of a zwitterionic substrate cephalexin in MATE1-deficient mice.

J Pharmacol Exp Ther 334, 651-656

Waters JS, Moss C, Pyle L, James M, Hackett S, A'hern R, Gore M, Eisen T (2004):
Phase II clinical trial of capecitabine and gemcitabine chemotherapy in patients with metastatic renal carcinoma.
Br J Cancer 91, 1763-1768

Wegner W, Burckhardt BC, Burckhardt G, Henjakovic M (2012):
Male-dominant activation of rat renal organic anion transporter 1 (Oat1) and 3 (Oat3) expression by transcription factor BCL6.
PLoS One 7, e35556

Wegner W, Burckhardt G, Henjakovic M (2014):
Transcriptional regulation of human organic anion transporter 1 by B-cell CLL/lymphoma 6.
Am J Physiol Renal Physiol 307, F1283-1291

Wright SH, Dantzer WH (2004):
Molecular and cellular physiology of renal organic cation and anion transport.
Physiol Rev 84, 987-1049

Wu MH, Yan B, Humerickhouse R, Dolan ME (2002):
Irinotecan activation by human carboxylesterases in colorectal adenocarcinoma cells.
Clin Cancer Res 8, 2696-2700

Wu W, Baker ME, Eraly SA, Bush KT, Nigam SK (2009):
Analysis of a large cluster of SLC22 transporter genes, including novel USTs, reveals species-specific amplification of subsets of family members.
Physiol Genomics 38, 116-124

Wu X, Huang W, Ganapathy ME, Wang H, Kekuda R, Conway SJ, Leibach FH, Ganapathy V (2000):
Structure, function, and regional distribution of the organic cation transporter OCT3 in the kidney.
Am J Physiol Renal Physiol 279, F449-458

Xu X, Wu J, Li S, Hu Z, Xu X, Zhu Y, Liang Z, Wang X, Lin Y, Mao Y, Chen H, Luo J, Liu B, Zheng X, Xie L (2014):
Downregulation of microRNA-182-5p contributes to renal cell carcinoma proliferation via activating the AKT/FOXO3a signaling pathway.
Mol Cancer 13, 109

Ye BH, Lista F, Lo Coco F, Knowles DM, Offit K, Chaganti RS, Dalla Favera R (1993):
Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma
Science 262, 747-750

Yokoo S, Yonezawa A, Masuda S, Fukatsu A, Katsura T, Inui K (2007):
Differential contribution of organic cation transporters, OCT2 and MATE1, in platinum agent-induced nephrotoxicity.
Biochem Pharmacol 74, 477-487

Yonezawa A, Masuda S, Yokoo S, Katsura T, Inui K (2006):

Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family).
J Pharmacol Exp Ther 319, 879-886

Zhang L, Dresser MJ, Gray AT, Yost SC, Terashita S, Giacomini KM (1997):

Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter.
Mol. Pharmacol 51, 913–921

Zhang S, Lovejoy KS, Shima JE, Lagpacan LL, Shu Y, Lapuk A, Chen Y, Komori T, Gray JW, Chen X, Lippard SJ, Giacomini KM (2006):

Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity.
Cancer Res 66, 8847-8857

Zhang Y, Laz EV, Waxman DJ (2012):

Dynamic, sex-differential STAT5 and BCL6 binding to sex-biased, growth hormone-regulated genes in adult mouse liver.
Mol Cell Biol 32, 880-896

Zhou SF (2008):

Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition.
Xenobiotica 38, 802-832

Danksagung

Ich bedanke mich zu allererst bei Frau **Dr. Maja Henjakovic**. Sie hat mich vom ersten Tag meiner Arbeit begleitet und stand mir mit ihrer stetigen Unterstützung und Geduld jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Ihre engagierte Betreuung hat entscheidend zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen.

Herrn **Prof. Dr. Gerhard Burckhardt**, meinem Doktorvater, bin ich für das Überlassen des Dissertationsthemas zu großem Dank verpflichtet. Er ermöglichte mir die Promotion in der Abteilung vegetative Physiologie und Pathophysiologie. Ich möchte mich für seine Anregungen beim Schreiben dieser Dissertation bedanken und dass ich ihn stets um Rat fragen konnte.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der Abteilung vegetative Physiologie und Pathophysiologie, insbesondere bei Frau **Gesche Dallmayer**, für ihre Unterstützung bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Promotion wissenschaftlich unterstützt und immer wieder motiviert haben. Deswegen danke ich **Christina Haas** und **Dr. Christian Engelke**.