

# Die Expression von nukleären Rezeptoren beim Nierenzellkarzinom

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Christian Wilhelm von der Gathen  
aus Bottrop

2012

Angefertigt mit der Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Professor Dr. med. Dr. h.c. Stefan C. Müller
2. Gutachter: Privatdozent Dr. med Peter H. Pennekamp

Tag der Mündlichen Prüfung: 02.07.2012

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie  
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. Stefan C. Müller

Meinen Eltern



## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	7
1. Einleitung .....	9
1.1 Nierenzellkarzinom .....	9
1.1.1 Anatomie und Funktion der Niere .....	9
1.1.2 Epidemiologie .....	10
1.1.3 Ätiologie.....	11
1.1.4 Morphologie.....	12
1.1.5 Klassifikation.....	12
1.1.6 Klinik und Diagnose.....	16
1.1.7 Therapie und Prognose .....	17
1.2 Nukleäre Rezeptoren .....	20
1.2.1 Peroxisom-Proliferator-Aktivierter-Rezeptor- $\gamma$ (PPARG) .....	21
1.2.2 Leber-X-Rezeptor- $\alpha$ (NR1H3).....	21
1.2.3 Farnesoid-X-Rezeptor (NR1H4) .....	22
1.2.4 Retinoid-X-Rezeptor (RXR $\alpha$ ) .....	22
1.3 Zielsetzung .....	24
2. Material und Methoden .....	25
2.1 Materialien .....	25
2.1.1 Geräte.....	25
2.1.2 Labormaterialien .....	26
2.1.3 Chemikalien.....	26
2.1.4 Lösungen.....	27
2.1.5 Kits.....	28
2.1.6 Primer .....	28
2.1.7 Software .....	30
2.2 Methoden.....	31
2.2.1 Gewebeproben .....	31
2.2.2 Isolierung von RNA aus Makrodissektions-Gefriergewebe.....	33
2.2.3 Isolierung von RNA aus Laser-Mikrodissektionsschnitten .....	33
2.2.4 Isolierung von RNA zur Primeretablierung.....	34
2.2.5 RNA-Konzentrationsmessung .....	35

2.2.6	RNA-cDNA Umschreibung .....	35
2.3	Polymerasekettenreaktion .....	36
2.3.1	Quantitative PCR .....	36
2.3.2	Primer Etablierung .....	41
2.3.3	Gelelektrophorese .....	48
2.4	Berechnung und Quantifizierung der Messergebnisse .....	49
2.4.1	Statistische Auswertung .....	51
3.	Ergebnisse .....	52
3.1	Nukleäre Rezeptoren in Nierenzellkarzinom und nicht malignen Gewebe .....	52
3.2	Nukleäre Rezeptoren in Korrelation zu den klinisch- pathologischen Parametern .....	58
3.2.1	Geschlecht .....	58
3.2.2	Alter .....	58
3.2.3	Pathologische Stadien .....	59
3.2.4	Tumorgröße .....	59
3.2.5	Metastasen .....	60
3.2.6	Grading .....	60
3.2.7	Veneneinbruch .....	61
3.3	Korrelation von mRNA und Protein-Leveln .....	61
4.	Diskussion .....	63
4.1	Expression nukleärer Rezeptoren .....	64
4.1.1	Expression von PPARG .....	64
4.1.2	Expression von NR1H3 .....	66
4.1.3	Expression von NR1H4 .....	67
4.1.4	Expression von RXRA .....	68
5.	Zusammenfassung .....	70
6.	Abbildungsverzeichnis .....	71
7.	Tabellenverzeichnis .....	72
8.	Literaturverzeichnis .....	73
9.	Danksagung .....	84

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BP	Basenpaare
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CAKI	Human Renal Carcinoma Cell Line
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives-Protein
CT	Computertomographie
Ct	Cycle Threshold
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	Desoxiuridin Triphosphat
E.coli	Escherichia Coli
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat
FLT-3	Fetal Liver Tyrosine Kinase 3
G-C	Guanin-Cytosin
HPRT-1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase
KIT	Rezeptor Tyrosin Kinase
LNCAP	Lymph node Carcinoma of the Prostate
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NR1H3	Leber-X-Rezeptor alpha
NR1H4	Farnesoid-X-Rezeptor
NTC	No Template Control
PBS	Phosphat Buffered Saline

PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Plateled Derived Growth Factor
PPARG- $\gamma$	Peroxisom Proliferator Aktivierter Rezeptor Gamma
qRT-PCR	Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion
RAF	Rapidly Growing Fibrosarcome
RCC	Renal Cell Carcinoma
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROX	6-Carboxyl-X-Rhodamine
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
RXR $\alpha$	Retinoid-X-Rezeptor
SDS	Sequence Detection Software
STD	Standartverdünnung
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat- EDTA-Puffer
TMA	Tissue Micro Array
TNM	Tumor-Lymphknoten-Metastasen Klassifikation
Tris-HCL	Tris-Hydrochlorid
TZD	Thiazolidinedione
UDG	Uracil-Desoxyribonukleinsäure-Glykosilase
UICC	Union for International Cancer Control
UV	Ultraviolette-Strahlung
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	von-Hippel-Lindau
WHO	World Health Organisation

## **1. Einleitung**

### **1.1 *Nierenzellkarzinom***

#### **1.1.1 Anatomie und Funktion der Niere**

Die Niere ist ein paarig angelegtes Organ, welches beidseits der Wirbelsäule retroperitoneal unterhalb des Diaphragmas, in der Fossa lumbalis liegt. Die Nieren sind bohnenförmig und braunrot, haben eine Länge von ca. 12 cm, eine Breite von ca. 6 cm und eine Dicke von ca. 3 cm. Das Gewicht liegt zwischen 120 und 200 g. Die Nieren sind von einer bindegewebigen Kapsel umhüllt und in einen lockeren Fettgewebskörper eingebettet, welcher die Niere abpolstert. Dieser wiederum ist in die Fascia Renalis eingefasst. Das Nierenparenchym besteht aus der Nierenrinde (Cortex renalis) und dem Nierenmark (Medulla renalis), welches 10-12 Markpyramiden beinhaltet. In diesen Pyramiden befinden sich die Nierenkelche, die in das Nierenbecken münden, aus dem der Ureter entspringt. Die Nieren regulieren den Wasser- und Elektrolythaushalt des Körpers und scheiden harnpflichtige Stoffwechselprodukte wie Harnsäure und Fremdstoffe wie Medikamente und Toxine aus. Zusätzlich halten die Nieren den Säure-Base-Haushalt im Gleichgewicht und damit den pH-Wert aufrecht. Des Weiteren werden in den Nieren Hormone wie Renin und Erythropoetin gebildet, die Einfluss auf den Blutdruck bzw. die Blutbildung nehmen.

### 1.1.2 Epidemiologie

Nach Angaben der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. ([www.gekid.de](http://www.gekid.de)) erkrankten 17400 Menschen im Jahre 2006 an Nierenkrebs. Im Erwachsenenalter stellen die Nierenzellkarzinome mit 85 % die häufigsten bösartigen Neubildungen der Niere dar und machen damit ca. 4 % aller Tumore im Erwachsenenalter aus, wohingegen im Kindesalter Nephroblastome (Wilms-Tumoren), Sarkome und Lymphome häufiger auftreten (Fischer, C. G., 1999; Motzer, R. J. et al, 1996). Die Neuerkrankungsrate in Deutschland stieg in der Zeit zwischen 1984 bis 2004 stetig an und hat sich bei Männern nahezu verdoppelt. Dies liegt nicht nur an der höheren Inzidenz, sondern auch an der früheren Erkennung durch verbesserte Diagnostik mit bildgebenden Verfahren und die optimierte Registrierung von Krebserkrankungen in Deutschland. Generell sind Männer doppelt so häufig betroffen wie Frauen (Nese, N. et al, 2009). Im Jahre 2006 lag der Anteil des Nierenkarzinoms an allen Krebserkrankungen laut Robert-Koch-Institut bei Männern bei 4,4 % und bei Frauen bei 3,3 %. Bei Männern nahmen Tumore der Niere und ableitenden Harnwege den 6. Platz aller Krebserkrankungen mit 10.750 Neuerkrankungen ein. Bei Frauen waren 6500 Neu-erkrankungen aufgetreten und belegen den 11. Platz in der Gesamthäufigkeit. Deutschland zeigte im Jahr 2006 im internationalen Vergleich nach Tschechien und den USA die höchste Neuerkrankungs- und Sterberate. Das häufigste Erkrankungsalter liegt im 6. Jahrzehnt. Karzinome treten in ca. 98 % der Fälle unilateral ohne Seitenprävalenz auf (Nese, N. et al, 2009). Die 5 Jahre-Überlebensrate hängt vom Malignitätsgrad ab und verschlechtert sich mit zunehmender Aggressivität von 76 % bei Grad I über 72 % bei Grad II zu 51 % bei Grad III und nur noch 35 % bei Grad IV (Bretheau, D. et al, 1995). Die Mortalität ist seit Mitte der neunziger Jahre rückläufig. In Deutschland verstarben im Jahre 2006 insgesamt 6.715 Patienten mit Nierentumoren.

### 1.1.3 Ätiologie

Die Ursachen für die Entstehung des RCC sind bisher nicht eindeutig geklärt. Eine multifaktorielle Entstehung wird wie bei den meisten Tumorerkrankungen auch beim Nierenzellkarzinom vermutet. Gesicherte Risikofaktoren sind Rauchen und Medikamente (z.B. Phenacetin mit analgetikabedingter Nephropathie). Des Weiteren vermutet man, dass auch Übergewicht durch fettreiche Kost, arterielle Hypertonie (Antihypertensiva, Diuretika) und chemische Noxen wie Asbest, Cadmium, Benzol oder Chlorkohlenwasserstoffe das Risiko an einem Nierenzellkarzinom zu erkranken erhöhen (Lipworth, L. et al, 2006; Motzer, R. J. et al, 1996). Ein deutlich erhöhtes Risiko besteht zudem bei Dialysepatienten. Ungefähr 40 % der Patienten entwickelten Nierenzysten im Verhältnis Männer zu Frauen von 3:1, wodurch das Krebsrisiko um das 40-fache zur Normalbevölkerung erhöht ist (Savaj, S. et al, 2003). Auch eine chronische Niereninsuffizienz erhöht insgesamt und unabhängig von der Ursache die Krebsentstehung (Nelson, E. C. et al, 2007). Eine familiäre Disposition oder ein vererbter Keimbahndefekt spielen bei ca. 10 % der Betroffenen eine Rolle. Hier ist neben dem tuberösen Sklerosekomplex und der Chromosom 3 Translokation vor allem das von-Hippel-Lindau (VHL) Syndrom zu erwähnen, bei dem Nierenzellkarzinome oft multifokal und häufiger in jüngerem Lebensalter auftreten. Das VHL-Syndrom ist eine autosomal dominant vererbte Mutation eines Tumorsuppressorgens, welches auf dem Chromosom p3 25-26 lokalisiert ist und bei dem 40 % der Patienten Nierenzellkarzinome, sowie Nieren- und Pankreaszysten und zerebelläre/spinale Hämangioblastome ausbilden. Zusätzlich fanden sich bei den sporadischen Formen des Nierenzellkarzinoms bei etwa 90% Veränderungen im Bereich des VHL-Gens (Motzer, R. J. et al, 2006). Das papilläre Nierenzellkarzinom wird autosomal-dominant vererbt und in einen milden (basophilen) Typ-I und einen aggressiven (eosinophilen) Typ-II eingeteilt (Morrison, P. J. et al, 2010). Bei dieser Untergruppe wurden die molekularen Veränderungen auf Chromosom 7 nachgewiesen (Linehan, W. M. et al, 2004).

#### **1.1.4 Morphologie**

Eine Unterteilung der Nierenkarzinome ist nach ihrem Ursprungsort, der Wuchsform und des histopathologischen Bildes möglich. Vom Nierenparenchym können sich verschiedene Tumore ableiten, wobei epitheliale Adenokarzinome häufiger als mesenchymale Tumore auftreten. Entsprechend der Wachstumsmuster lassen sich hellzellige (klarzellige) von papillären (10-15 %), chromophoben (5-10 %) und Sammelrohrkarzinomen (1-2 %) unterscheiden. Den größten Anteil der Nierenzellkarzinome stellt mit ca. 80 % das klarzellige Karzinom, welches immunhistochemische Differenzierungsmerkmale des proximalen Tubulus trägt. Die Schnittfläche ist hellgelb bis grauweiß und oft mit Nekrosen, Blutungen und Zystenbildung vergesellschaftet. Die Zellen haben aufgrund des hohen Glykogen- und Lipidgehaltes ein helles oder eosinophiles Zytoplasma und dadurch ein pflanzenzellartiges Aussehen. Die anderen oben genannten histologischen Typen entstehen in den weiter distal gelegenen Epithelien der Sammeltubuli.

#### **1.1.5 Klassifikation**

Um das biologische Potential sowie die Prognose eines Nierenzellkarzinoms einschätzen zu können und einen entsprechenden Behandlungsplan zu erstellen, wird es durch so genanntes Staging und Grading eingestuft. Das Staging oder Tumorstadium beschreibt die anatomische Ausdehnung einer Neoplasie, wobei zwischen klinischem Staging, welches Ergebnisse klinischer und bildgebender Untersuchungen nutzt und postoperativem Staging, welches von einem Pathologen nach Organ- bzw. Biopsieentnahmen erstellt wird, unterschieden wird. Die Kategorien sind bei beiden identisch, wobei das postoperative Staging mit einem „p“ Präfix (pTNM) dargestellt wird. Am gebräuchlichsten ist das in Tab.1 aufgeführte TNM-Staging der WHO beziehungsweise der UICC in der letzten Fassung von 2009.

## Primärtumor

---

<b>TX</b>	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
<b>T0</b>	Kein Anhalt für Primärtumor
<b>T1</b>	Tumor 7 cm oder weniger in größter Ausdehnung begrenzt auf die Niere
<b>T1 a</b>	Tumor 4 cm oder weniger in größter Ausdehnung
<b>T1 b</b>	Tumor mehr als 4 cm, aber nicht mehr als 7 cm in größter Ausdehnung
<b>T2</b>	Tumor mehr als 7 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
<b>T2 a</b>	Tumor mehr als 7 cm, aber nicht mehr als 10 cm in größter Ausdehnung
<b>T2 b</b>	Tumor mehr als 10 cm in größter Ausbildung
<b>T3</b>	Tumor breitet sich in größere Venen aus oder infiltriert direkt perirenales Gewebe, jedoch nicht in ipsilaterale Nebenniere und nicht über Gerota-Faszie hinaus.
<b>T3 a</b>	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in die Nierenvene oder ihre segmentalen Äste (mit muskulärer Wand) oder mit Infiltration des perirenales und/oder peripelvinen Fettgewebes, aber nicht über die Gerota-Faszie hinaus
<b>T3 b</b>	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in die Vena cava unterhalb des Zwerchfells
<b>T3 c</b>	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in die Vena cava oberhalb des Zwerchfells oder mit Infiltration der Wand der Vena cava
<b>T4</b>	Tumor infiltriert über die Gerota-Faszie hinaus (eingeschlossen die kontinuierliche Ausbreitung in die ipsilaterale Nebenniere)

## Metastasen

<b>Nx</b>	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
<b>N0</b>	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
<b>N1</b>	Metastase(n) in einem regionären Lymphknoten
<b>N2</b>	Metastasen in mehr als einem Lymphknoten

## Fernmetastasen

<b>Mx</b>	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen
<b>M1</b>	Fernmetastasen

---

**Tab. 1: TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinom**

Die Klassifikation des Nierenzellkarzinoms erfolgt nach Tumorgröße und Tumorausdehnung, Lymphknotenbefall und Metastasen durch das TNM-Schema.

Das „T“ gibt die Größe und Ausdehnung des Primärtumors an. „N“ informiert über die Ausbreitung in regionale Lymphknoten. Dazu zählen hiläre, abdominelle, paraaortale und paracavale Lymphknoten. „M“ gibt das Vorhandensein von Fernmetastasen an. Diese Metastasen liegen gehäuft in Lunge (75 %), Knochen (40 %), Leber (30 %), Nebennieren (20 %) und Hirn (15 %). Zusätzlich werden noch weitere Parameter wie Einbruch in Lymph- oder Blutgefäße, sowie das Vorhandensein von residuellem Tumorgewebe angegeben. Das Grading dient der Bestimmung des Tumor Differenzierungsgrads und berücksichtigt die mitotische Aktivität, Kerngröße und Kernpleomorphie, sowie die Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe. Je höher die Gradingstufe desto geringer ist die Differenzierung ausgeprägt und somit höher ist der Malignitätsgrad. International wird vor allem das Gradingssystem nach Fuhrmann angewendet, welches in Tab. 2 aufgeführt ist.

---

<b>GX</b>	Differenzierungsgrad nicht bestimmbar
<b>G1</b>	Regelmäßige runde Kerne von normaler Größe, kleine nicht vergrößerte Nukleoli, fast keine Mitosen
<b>G2</b>	Kerne größer als normal, Anisonukleose, Chromatinverdichtung, vergrößerte Nukleoli, vereinzelt Mitosen, ggf. mehrkernige Riesenzellen
<b>G3</b>	Ausgeprägte Kernpleomorphie, stark vergrößerte Nukleoli, Tumoriesenzellen, zahlreiche und auch atypische Mitosen
<b>G4</b>	Anaplastische Zellen

---

**Tab. 2: Gradingssystem nach Fuhrmann**

Das Gradingssystem nach Fuhrmann dient der Differenzierung des Tumors. Es berücksichtigt die mitotische Aktivität, Kerngröße, Kernpleomorphie sowie die Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe.

Zur pathologisch-anatomischen Einteilung des Nierenzellkarzinoms wird das TNM-Schema der „International Union Against Cancer“ (UICC) angewendet. Dieses berücksichtigt die Größe und örtliche Ausdehnung des Primärtumors, sowie den potentiellen Lymphknotenbefall und Metastasen (siehe Tab. 3). Darüber hinaus zeigt Tab. 3 die stadienabhängige 5-Jahres-Überlebensrate.

Stadium	TNM-Gruppen	Prognose (5-Jahres- Überlebensrate)
<b>I</b>	T1 N0 M0	70-90 %
<b>II</b>	T2 N0 M0	50-60 %
<b>III</b>	T1/2 N1 M0	20-30 %
	T3 N0 M0	30-50 %
	T3 N1 M0	10-20 %
<b>IV</b>	T4 jedes N jedes M	0-10 %
	Jedes T N2 jedes M	
	Jedes T jedes N M1	

**Tab. 3: TNM-Schema der UICC („International Union Against Cancer“)**

Die pathologisch-anatomische Einteilung des Nierenzellkarzinoms erfolgt in vier verschiedenen Stadien. Diese sind mit der entsprechenden TNM-Gruppe und der 5-Jahres-Überlebensrate in der Tabelle dargestellt.

### 1.1.6 Klinik und Diagnose

Heutzutage werden mehr als 60 % aller Nierenkarzinome im Rahmen bildgebender Untersuchungen als Zufallsbefunde ohne Symptomäußerungen der Patienten entdeckt. Die klinische Symptomatik tritt relativ spät ein, wobei zu 50-60 % die Hämaturie das häufigste Symptom darstellt (Bono, A. V. und Lovisolo, J. A., 1997). Bei 30 % lässt sich ein vergrößertes Organ tasten. Der Tumor entsteht meist im Nierenpol und ist bei Diagnosestellung zu 90 % zwischen 3 und 15 cm groß. Die klassische Symptomtrias aus Flankenschmerz, Hämaturie und palpablem Flankentumor tritt heute nur bei weniger als 10 % der Patienten auf (Ares, Valdes Y., 2009; Mohammad, A. und McClintock, C., 2007). Prognostisch ungünstig wirken sich lokale tumorassoziierte, sowie eine

systemische Symptomatik aus. Dazu gehören Anämie, Hämaturie, hepatische Dysfunktion (Stauffer-Syndrom), Gewichtsverlust, Hypalbuminämie, Hyperkalzämie, Flankenschmerz und Unwohlsein. Klinische Untersuchungen wie Blutbild, Gerinnungsstatus, Kreatinin, alkalische Phosphatase und bildgebende Diagnostik, wie CT oder MRT von Abdomen und Becken, dienen dem prätherapeutischen Nachweis oder dem Ausschluss von infiltrativem Tumorwachstum oder Metastasen (Oliech, J. S., 1998). Bei entsprechender Fragestellung können nach Bestimmung der Nierenfunktionsparameter und des Urinstatus, zusätzlich Ausscheidungsurographie, Nierenfunktionsszintigraphie oder Knochenszintigraphie erforderlich werden. Trotz intensiver Forschung an Tumormarkern steht für die Routinediagnostik noch keiner zur Verfügung. Dies gilt sowohl für die Primärdiagnose, als auch für die Verlaufskontrolle des Nierenkarzinoms. Die Laborbefunde sind unpräzise (BSG-Erhöhung) und oft Ausdruck einer bereits vorliegenden Fernmetastasierung und damit der fortgeschrittenen Erkrankung. Unter Kontrolle bildgebender Verfahren wie Ultraschall, CT können in seltenen Fällen unklare Raumforderungen durch perkutane Biopsien abgeklärt werden. Dabei ist das hohe Risiko falsch negativer Befunde oder die Verschleppung von Tumorzellen im Stichkanal, gegen die diagnostischen Ergebnisse abzuwägen. Gerade im Hinblick auf neue Verfahren wie perkutane Kryoablation oder Radiofrequenztherapie kleinerer Tumore ist dieser Punkt zu berücksichtigen.

### **1.1.7 Therapie und Prognose**

Die Therapie der Wahl stellt die Operation dar, wobei die vollständige Entfernung des Tumorgewebes das Hauptziel bildet. Der Umfang der Operation richtet sich nach dem Stadium der Krebserkrankung. Kleine oder peripher gelegene Tumore (unter 4 cm) werden meist partiell nephrektomiert (Polresektion, Keilresektion oder Heminephrektomie), wobei in kleinem Sicherheitsabstand im gesunden Gewebe operiert wird. Diese Operationsformen zeigen im Outcome gegenüber dem radikalen Vorgehen vergleichbare Ergebnisse (Van Poppel, H., 2010). Bei größeren und ungünstig gelegenen Tumoren, sowie beim metastasierten Nierenzellkarzinom wird die radikale Tumornephrektomie durchgeführt. Die Niere wird nach Ligatur der renalen Gefäße gemeinsam mit Fettkapsel, Gerota'scher Faszie, sowie den regionären Lymphknoten

entfernt (deKernion, J. B. und Mukamel, E., 1987). Letzteres dient dazu eine weitere Tumorausbreitung erfassen zu können. Die Entfernung der ipsilateralen Nebenniere wird aufgrund der niedrigen Inzidenz eines Befalls und der guten diagnostischen Möglichkeiten (CT) nicht mehr generell vorgenommen (Moudouni, S. M. et al, 2002). Die imperative Indikation für organerhaltendes Verfahren ist nur bei Einzelnieren, bilateralen Tumoren und Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion gegeben. Bei bilateralen Tumoren wird zuerst die Niere mit besserer Funktionalität und Tumorkomplexion operiert. Hierbei besteht das Risiko, dass der Patient nach der Radikaloperation dialysepflichtig wird. Das primär metastasierte Nierenzellkarzinom sollte beim Vorliegen von Symptomen (Schmerzen/Hämaturie) palliativ entfernt werden. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass sich dieses Vorgehen zusammen mit der kompletten Metastasenresektion positiv auf das Überleben des Patienten auswirkt (Ather, M. H. et al, 2010;Thyavihally, Y. B. et al, 2005). Bei sehr kleinen Tumoren unter 3 cm oder palliativen Situationen können durch Radioablation und Kryotherapie gute Ergebnisse erzielt werden. Durch lokale Erhitzung bzw. Kühlung des Tumorgewebes wird eine Koagulationsnekrose hervorgerufen und dadurch der Zelltod herbeigeführt (Naitoh, Y. et al, 2010). Diese Eingriffe können perkutan oder auch minimal invasiv laparoskopisch vorgenommen werden. Mit der zuletzt genannten Technik sind auch komplette Tumorresektionen möglich. Bei inoperablen Hirn- und Knochenmetastasen wird eine Strahlentherapie durchgeführt (Fokas, E. et al, 2010). Eine zytostatische Chemotherapie mit Vinblastin oder 5-Fluorouracil spielt aufgrund einer primären Multi-drug Resistenz und der mäßigen Prognose keine Rolle mehr (Albouy, B. et al, 2010). Die Therapie bei fortgeschrittenem und metastasiertem Nierenzellkarzinom stellte in den letzten 20 Jahren die Immuntherapie mit Interferon-alpha und Interleukin-2 als Mono- oder Kombinationstherapie dar. Die Behandlung hatte neben einer geringen Verbesserung der Symptomatik auch ungewünschte Nebenwirkungen zur Folge und findet heute nur noch selten Anwendung (Oya, M., 2006). Neue Ansätze liegen in der Antivaskulären- („Targeted“)-Therapie. Mit monoklonalen Antikörpern oder Enzyminhibitoren werden vermehrt Nierenzellkarzinome behandelt. Diese werden in Mono-oder Kombinationstherapie mit Cytokinen eingesetzt und können die Überlebenszeit positiv beeinflussen. Der Rezeptor-Thyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib (Sutent<sup>®</sup>) besitzt antiproliferative und antivaskuläre Aktivität. Dadurch wird der VEGF (vascular endothelial growth factor) und

PDGF (platelet derived growth factor) Rezeptor an Endothelzellen und Perizyten der Blutgefäße gehemmt (Escudier, B. und Albiges, L., 2011). Sorafenib (Nexavar<sup>®</sup>) stellt eine Option zur Zweitlinientherapie dar und wird bei Nichtansprechen von Sunitinib oder anderen Signaltransduktionshemmern eingesetzt. Dieses Medikament blockiert die RAF-Kinase, VEGF- und PDGF-Rezeptorkinasen sowie KIT und FLT-3 (Specia, J. et al, 2006). Ein monoklonaler Antikörper gegen VEGF ist das aus der Gruppe der Immunglobuline stammende Bevacizumab (Avastin). Dieses bindet an den Wachstumsfaktor, verhindert somit das Andocken des VEGF-Rezeptors auf Endothelzellen benachbarter Blutgefäße und wird in Kombinationstherapie mit Interferon-alpha genutzt (Motzer, R. J. und Bukowski, R. M., 2006; Rathmell, W. K. und Godley, P. A., 2010). Eine Therapiemöglichkeit für fortgeschrittene Nierenzellkarzinome bieten mTOR-Inhibitoren (mammalian Target of Rapamycin). Temsirolimus hemmt den Phosphatidylinositol-3-Kinase Weg, der die Translation verschiedener auf den Zellzyklus und das Zellwachstum (Angiogenese) wirkenden Proteasen steuert. Everolimus kommt als „Second-Line“ Medikament bei unzureichendem Behandlungserfolg zum Einsatz (Albouy, B. et al, 2010). Zahlreiche prognostische Parameter für das Nierenzellkarzinom sind vorhanden. Dazu zählen anatomische Parameter wie Tumorstadium und Größe, genauso wie die klinische Symptomatik bei Diagnose und der Allgemeinzustand des Patienten. Des Weiteren spielt auch der histologische Subtyp nach Fuhrman eine Rolle (Delahunt, B. et al, 2007). Generell ist zu sagen, dass beim Vorliegen von Metastasen die Prognose ungünstig ist. Bei Befall von Lymphknoten sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate auf 20-30 %. Bei vorliegenden Organmetastasen verringert sich diese auf nur noch 0-10 %, wenn andere negative Prognosefaktoren hinzukommen (Größe über 7 cm, Faziendurchbruch, Lymphknotenmetastasen). Um die prognostischen Modelle zu verbessern, erhofft man sich auf genetischer Ebene durch Forschung an molekularen Markern neue Erkenntnisse zu gewinnen (Lam, J. S. et al, 2005).

## **1.2 Nukleäre Rezeptoren**

Nukleäre Rezeptoren stellen eine Superfamilie von Transkriptionsfaktoren dar, die bei der Entwicklung, Differenzierung und Homöostase der Zelle mitwirken (Gronemeyer, H. et al, 2004). Viele dieser Rezeptoren sind ligandenaktivierbare Transkriptionsfaktoren, die spezifisch die Transkription von Zielgenen regulieren und dadurch eine direkte Verbindung zwischen extrazellulären hormonellen Signalen und transkriptionellen Antworten ermöglichen können. Die Bindung kann als Monomer, Hetero- oder Homodimer in deren Promotorbereich an cis-wirkenden DNA-Abschnitten (Response Elements) erfolgen. In den letzten 15 Jahren wurde eine Vielzahl von nukleären Rezeptoren identifiziert, die eine wichtige Rolle in der Regulation des Lipidstoffwechsels, der Organisation genetischer Netzwerke und beim Energiestoffwechsel spielen (Schulman, I. G., 2010). Es lassen sich drei verschiedene Hauptgruppen von nukleären Rezeptoren unterscheiden. Die Typ-1-Rezeptoren stellen die klassischen Steroidrezeptoren dar (Glukokortikoid- Östrogen- und Androgenrezeptor). Des Weiteren gibt es Nicht-Steroidrezeptoren (Typ-2-Rezeptoren), zu denen man den Schilddrüsenhormonrezeptor, Vitamin-D3-Rezeptor und den 9-cis-Retinsäure-Rezeptor (RXR) zählen kann. Als letzte Gruppe sind die so genannten Waisen-Rezeptoren (Orphan-Rezeptoren) zu nennen, für die noch kein Ligand gefunden wurde. Die in dieser Arbeit untersuchten nukleären Rezeptoren gehören allesamt zur Hauptgruppe der Typ-2-Rezeptoren (Nicht-Steroidrezeptoren).

### **1.2.1 Peroxisom-Proliferator-Aktivierter-Rezeptor- $\gamma$ (PPARG)**

PPAR $\gamma$  findet sich vermehrt im Fettgewebe und erhöht nach Aktivierung die Anzahl von Glukosetransportern. Damit wird die Glukoseaufnahme in die Zelle gesteigert und der Stoffwechsel angetrieben (Dello, Russo C. et al, 2003). Mutationen in diesem Rezeptor lösten im Fettgewebe eine Lipodystrophie aus (Jeninga, E. H. und Kalkhoven, E., 2010). In der Leber dagegen wurde die Glykolyse gesteigert und die Glukoneogenese gehemmt. Dieser Rezeptor wirkt zusätzlich auf den Insulinhaushalt ein, indem er die Expression des Tumornekrosefaktors- $\alpha$  senkt, der als eine Ursache für die Insulinresistenz gilt. Neue Diabetes Medikamente wie Thiazolidinedione oder Glitazone binden an den PPAR- $\gamma$  Rezeptor und können dadurch die Insulinsensitivität erhöhen (Keller, U., 2006). Beim Nierenzellkarzinom führte die Bindung spezieller Rezeptorliganden zu einer Blockade des Glukosemetabolismus. Dies hatte inhibitorische Effekte auf die Zellproliferation zur Folge und konnte Apoptose in den Tumorzellen auslösen. Hierdurch entsteht die Vermutung, dass Liganden einen potentiellen antitumorösen Effekt besitzen und zukünftig zur Tumorthherapie eingesetzt werden könnten (Yang, F. G. et al, 2005).

### **1.2.2 Leber-X-Rezeptor- $\alpha$ (NR1H3)**

Der Leber-X-Rezeptor- $\alpha$  spielt eine wichtige Rolle bei der Immunantwort, wo er antiinflammatorische Prozesse und die T-Zell-Proliferation beeinflusst (Kim, K. H. et al, 2010). Des Weiteren ist er an der Cholesterolumhomöostase, sowie in den Abläufen von Glukose- und Gallensäurenmetabolismus beteiligt (Nilsson, M. et al, 2007). Der Rezeptor fungiert hierbei als Cholesterolum-Sensor und induziert die Transkription von Genen, die die Zellen vor einem Cholesterolumüberschuss bewahren (Zhao, C. und Dahlman-Wright, K., 2010). Beispielsweise konnte der Steroidmetabolismus vor kurzem in Beziehung mit einer Immunantwort durch Leber-X-Rezeptor-Signalwege gebracht werden. In Tumoren wurden LXR-Liganden exprimiert, die eine sonst durch dendritische Zellen ausgelöste Immunantwort verhinderten. Für Tumoren bedeutet dieser Mechanismus die Möglichkeit der Ausschaltung des Immunsystems mit

Einbeziehung des Cholesterolfstoffwechsels. Ein Eingriff in diesen Mechanismus könnte die Anti-Tumorimmunität wiederherstellen (Villablanca, E. J. et al, 2010). Des weiteren wurde kürzlich gezeigt, dass LXR-Liganden die Zellproliferation im Kolon-Karzinom und anderen Krebszelllinien unterdrücken konnten (Mehrotra, A. et al, 2011). Im Detail wurde hierbei ein Zellzyklusarrest durch erhöhte lipogene Aktivität in der G1/S Phase beobachtet (Chuu, C. P., 2011;Kim, K. H. et al, 2010).

### **1.2.3 Farnesoid-X-Rezeptor (NR1H4)**

Der Farnesoid-X-Rezeptor ist ein zentraler Regulator der Gallensäurenproduktion und des Lipidstoffwechsels. Des Weiteren hat er auch eine regulatorische Funktion in der Glukosehomöostase (Ma, K. et al, 2006). Vorausgegangene Studien zeigten, dass funktionsuntüchtige Rezeptoren entzündliche Lebererkrankungen aufgrund des gestörten Gallensäurehaushalts auslösten und zur Apoptose von Hepatozyten führten. Außerdem wurden beim Vorliegen von defekten Rezeptoren Gene des Zellzyklus und für Entzündungsmediatoren nach oben reguliert (Yang, F. et al, 2007). Bei Pankreastumoren mit gleichzeitig vorliegenden Lymphknotenmetastasen wurde eine Überexpression des Rezeptors nachgewiesen, welche mit einer geringen Überlebenswahrscheinlichkeit verbunden war. Hierbei zeigte sich, dass eine Aktivierung des Rezeptors zu verstärkter Zellmigration und Invasion führte (Lee, J. Y. et al, 2011). Lax et. al. zeigten allerdings kürzlich in Untersuchungen zu Kolonkarzinomen, dass eine erhöhte Rezeptorexpression mit einem mildereren Verlauf der Erkrankung in Zusammenhang stand (Lax, S. et al, 2011).

### **1.2.4 Retinoid-X-Rezeptor (RXR $\alpha$ )**

Der sehr komplexe Retinoid-X-Rezeptor kann die Transkription sowohl als Homodimer als auch als Heterodimer mit z.B. PPARG und NR1H4 aktivieren und ist damit einer der wichtigsten Dimerisierungspartner. RXR $\alpha$  spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der angeborenen Immunität (Nunez, V. et al, 2010), sowie in den Stoffwechselfvorgängen von Glukose, Fettsäure und Cholesterolf. Zusätzlich sind die

Einflüsse auf den Typ-2-Diabetes und Atherosklerose zu nennen (Ahuja, H. S. et al, 2003). Der Rezeptor nimmt Einfluss auf zahlreiche physiologische Prozesse, spielt aber auch eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese. Dies wiesen unter anderen Petta et. al. anhand von Studien an Urothelkarziomen der Blase nach (Petta, E. et al, 2010). Bei Untersuchungen zu Kolon und Leberzellkarzinomen konnten vermehrt inaktivierte RXRa Rezeptoren vorgefunden werden, die sich im phosphorylierten Zustand befanden. Im Normalgewebe lag der Rezeptor dagegen vermehrt im unphosphorylierten Zustand vor (Shimizu, M. und Moriwaki, H., 2008; Yamazaki, K. et al, 2007). Dieser an zahllosen Stoffwechselfvorgängen beteiligte und ubiquitär vorkommende Rezeptor wird in Zukunft ein viel versprechendes Ziel für therapeutische Interventionen bieten.

### **1.3 Zielsetzung**

Die von mir untersuchten nukleären Rezeptoren wirken allesamt auf Energiestoffwechselprozesse und Entzündungsreaktionen ein, die in tumorösen Geweben oftmals gesteigert sind. In diesem Zusammenhang ist der Rezeptor PPAR- $\gamma$  bisher am Besten erforscht worden. In verschiedenen Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass PPAR- $\gamma$  Rezeptoren in Nierenkarzinomzellen um ein Vielfaches höher exprimiert wurden als im Normalgewebe (Yang, F. G. et al, 2005). Nach Bindung von speziellen Liganden an die nukleären Rezeptoren konnte ein Wachstumstop festgestellt sowie zelluläres Schrumpfen und letztendlich die Apoptose der Tumorzelle beobachtet werden (Yoshimura, R. et al, 2003). Zukünftig könnten nukleäre Rezeptoren als Ansatzpunkt für neue Behandlungsstrategien in Frage kommen. Zur Untersuchung dieser These wurden in dieser Arbeit neben PPAR- $\gamma$  die Rezeptoren NR1H3, NR1H4 und RXR $\alpha$  verwendet. Die vier ausgesuchten nukleären Rezeptoren stellen interessante Kandidaten in der targeted Therapie dar, da diese bereits erhältlich sind und über die Expression von Genen, den Lipid- und Lipoproteinmetabolismus sowie die Glukosehomöostase kontrollieren. In diesem Zusammenhang ist es von bedeutendem Interesse den Einfluss dieser Rezeptoren in Tumoren zu evaluieren. Zum Vergleich der Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe wurde nach Durchführung einer quantitativen Echtzeit PCR eine relative, normalisierte und effizienzkorrigierte Quantifizierung der Messergebnisse vorgenommen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 *Materialien*

#### 2.1.1 **Geräte**

8-Kanal-Pipette (1-10 µl)	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Absorptionsspektrometer Nanodrop ND-1000®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermocycler (UNO-Thermoblock)	Biometra, Göttingen, Deutschland
Einkanal-Pipetten Research® (0,5-10µl, 2-20µl, 10-100µl, 20-200µl, 100-1000µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Sigma 4-K15	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Gel Dokumentationsanlage mit Kamera Classic Uno	Intas, Göttingen, Deutschland
Horizontalelektrophoresekammer Sub-cell GT-Basic	Biorad Laboratories, Hercules, California
ABI Prism 7900 HAT Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
Mikrozentrifuge Sigma 1-15	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Tischzentrifuge Universal 30 RF	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Spannungsquelle PowerPac 100	Biorad Laboratories, Hercules, California, USA

### 2.1.2 Labormaterialien

PCR-Tubes (0,2 ml)	ABGene, Epsom, England
Pipettenspitzen mit Filter (10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Safe-Lock Tubes (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermo- Fast 384-Well-PCR Platten	ABGene, Epsom, England
Latexhandschuhe DermaClean	Ansell LTD, Bangkok, Thailand
Falcon Tubes (15ml, 50ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
BD-Plastipak Spritze (1ml)	Becton Dickinson, New Jersey, USA
BD-Microlance Kanüle	Becton Dickinson, New Jersey, USA

### 2.1.3 Chemikalien

Die nachfolgend aufgeführten Chemikalien besaßen den höchsten erhältlichen Reinheitsgrad und wurden in Analysenqualität erworben. Ihre Lagerung erfolgte nach den Herstellervorschriften.

Borsäure	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Deionisiertes Wasser aus Reinstwassersystemanlage Milli-Q biocel	Millipore, Molsheim, Frankreich
Dekontaminationsmittel RNaseAWAY®	Molecular BioProducts, San Diego, USA
DEPC-Wasser	Ambicon, Austin, Texas, USA
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Ethanol absolut	VWR, Darmstadt, Deutschland

Ethylendinitrilotetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
PCR-Wasser	Sigma Chemical CO, Irvine, UK
Phosphat Buffered Saline (PBS)	Bio Whittaker, Walkersville, MD, USA
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Fluka, Buchs, Schweiz
SYBR <sup>®</sup> Safe DNA gel stain	Invitrogen, Paisley, England
10 und 50 bp DNA Ladder	Invitrogen, Paisley, England

#### 2.1.4 Lösungen

1% DEPC- Wasser	1ml DEPC in 1000ml entionisiertem Wasser gelöst, inkubiert für 24 Stunden, anschließend autoklaviert
6x Ladepuffer	MBI Fermentas
TBE (10x)	Tris-HCl 107,81 g/L, EDTA-Na 7,44 g/L, Borsäure 55 g/L, pH 8 in 1000 ml entionisiertem Wasser gelöst
1mM Tris-HCl	1mM Tris-HCl in DEPC-Wasser gelöst
1x TE Puffer	10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8
RPMI-1640	500 ml Hydrogencarbonat-Puffersystem 50 ml hitzeinaktiviert
10% Kälberserum	
PBS	3 ml Phosphat gepufferte Salzlösung, ohne Mg, ohne Ca
Trypsin	1-fach mit EDTA
Pen-Strep	Penicillin/Streptomycin 35 U/ml

### 2.1.5 Kits

Die Kits wurden entsprechend der Herstellervorschriften gelagert. Zur Vermeidung von Verunreinigungen und mehrfachem Einfrieren wurden Aliquots hergestellt.

SuperScript™ III First-Strand Synthesis Super Mix für qRT-PCR	Invitrogen, Paisley, England
SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix for ABI Prism®	Invitrogen, Paisley, England
PureLink™ RNA Mini Kit	Invitrogen, Paisley, England

### 2.1.6 Primer

Alle in dieser Studie verwendeten „intron spanning“ Primer wurden im Reinheitsgrad entsalzt und von Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland bezogen. Diese Primer zeichnen sich dadurch aus, dass Intronabschnitte übergangen werden und somit keine genomische-DNA im Reaktionsansatz amplifiziert werden kann. Das Material wurde in gefriergetrocknetem Zustand geliefert und durch die Zugabe einer entsprechenden Menge eines 1-fach konzentrierten Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer) gelöst, um eine Konzentration von 100 pmol/µl zu erhalten. Diese Stocklösung wurde anschließend bei -20 °C gelagert. Zum experimentellen Gebrauch wurde die Lösung auf eine Konzentration von 10 pmol/µl mit PCR Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt. Generell ist zuzufügen, dass PCR-Primer eine typische Länge von 18-30 Basen aufweisen. Kurze Primer mit weniger als 15 Nukleotiden binden sehr effizient, sind aber oftmals nicht spezifisch genug. Lange Primer weisen eine hohe Spezifität auf, haben aber eine niedrigere Effizienz beim Annealing und führen so zu verminderter Produktausbeute. Des weiteren sollten Primer eine möglichst einmalige Sequenz aufweisen und repetitive Sequenzen vermieden werden. Zusätzlich sind für das Primer Design die folgenden Kriterien wichtig: Das PCR Produkt sollte nicht länger als 150 Basenpaare sein. Komplementäre Sequenzen zwischen Primern, „*Missmatch*“ sowie ein T am 3' Ende sind zu vermeiden. Der Primer sollte 18-30 Nukleotide, einen G-C Gehalt von 40-60 %

aufweisen sowie eine Schmelztemperatur von 58-60 °C besitzen. In Tab. 4 sind die Sequenzen und Amplikonlängen der in dieser Studie verwendeten Primer sowie deren Basenpaarlängen dargestellt.

Primer	5´-Primersequenz-3´	Länge (BP)
<b>PPARG-II</b>		
<b>Genbank-Sequence:</b>	NM_005037	
Amplikon: 95 BP		
Forward	GAC CTG AAA CTT CAA GAG TAC CAA A	25
Reverse	TGA GGC TTA TTG TAG AGC TGA GTC	24
<b>NR1H3-I</b>		
<b>Genbank-Sequence:</b>	NM_005123	
Amplikon: 78 BP		
Forward	CAG GGC TCC AGA AAG AGA TG	20
Reverse	ACA GCT CCA CCG CAG AGT	18
<b>NR1H4-II</b>		
<b>Genbank-Sequence:</b>	NM_005123	
Amplikon: 75 BP		
Forward	ACC TGT GAG GGG TGT AAA GGT	21
Reverse	GCC CCC GTT TTT ACA CTT G	19
<b>RXRA-II</b>		
<b>Genbank-Sequence:</b>	X52773	
Amplikon: 86 BP		
Forward	CAT CGT CCT CTT TAA CCC TGA	21
Reverse	CCA AGG ACG CAT AGA CCT TC	20

**Tab. 4: Sequenzen und Amplikonlängen der Primer**

Die Tabelle zeigt die Sequenzen und Amplikonlängen der in dieser Studie verwendeten Primer sowie deren Basenpaarlängen (BP).

Der vom urologischen Labor der Universität Bonn zur Verfügung gestellte Housekeeper HPRT1 wurde zur Normalisierung des RNA-Inputs verwendet (Glenn, S. T. et al, 2007). Der Housekeeper wird so ausgewählt, dass das Gen unabhängig vom Zelltyp und äußeren Einflüssen in allen Zellen exprimiert und nicht reguliert wird. Er kann zum Vergleich von Tumor- und Normalgewebe herangezogen werden und somit eine relative Quantifizierung ermöglichen. Die Sequenzen und Basenpaarlängen des verwendeten Housekeepers HPRT1 sind in Tab. 5 abgebildet.

Primer	5´-Primersequenz-3´	Länge (BP)
HPRT1		
<b>Genbank-Sequence:</b>	NC_000023.10	
Forward	TGA CCT TGA TTT ATT TTG CAT ACC	24
Reverse	CAT CTC GAG CAA GAC GTT CA	20

**Tab. 5: Sequenzen und Basenpaarlänge von HPRT1**

Die Tabelle zeigt die Sequenzen und die Basenpaarlängen (BP) des in dieser Studie verwendeten Primers HPRT1, der als Housekeeper fungierte.

### 2.1.7 Software

MS Office 2003	Microsoft, Seattle, USA
SDS Software Version 2.1	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
SPSS Version 18	SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Gewebeproben**

In die Studie wurden 46 Patienten eingeschlossen, die sich auf Grund eines Nierenzellkarzinoms im Zeitraum von 1998-2006 in der Klinik und Poliklinik für Urologie der Universität Bonn (n= 26) und der Universität Erlangen (n= 20) einer radikalen Nephrektomie unterzogen hatten. Zur Kontrolle wurde jedem dieser Patienten eine Normalgewebeprobe entnommen, in der keine Karzinomzellen gefunden werden konnten. Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis zur molekularbiologischen Untersuchung ihres Gewebes. Zusätzlich wurden die klinischen Daten der Patienten sowie pathologische Merkmale der Tumoren erfasst. Dazu gehörten das Geschlecht und Alter des Patienten, das Tumorstadium nach TNM-System, der Differenzierungsgrad (Grading), die Größe des Tumors, möglicher Veneneinbruch, das Alter zum Operationszeitpunkt sowie die Aussage über einen möglichen Zufallsbefund. Eine Übersicht über die klinisch-pathologischen Parameter des untersuchten Patientenkollektivs ist in Tab. 6 dargestellt. Der Aufbau der Gewebedatenbank wurde von der Ethikkommission der Universität Bonn genehmigt. Die Untersuchungen wurden auf Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes 1983 und den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen durchgeführt.

	<b>Bonn</b> n= 26	<b>Erlangen</b> n= 20	<b>Gesamt</b> n= 46
<b>Alter</b>			
Median	65,5	70,5	67
Mittelwert	63,54	67,9	65,43
Spannweite	43-75	41-88	41-88
<b>Geschlecht</b>			
M	18	11	29
W	8	9	17
<b>pT-Stadium</b>			
T1	9	10	19
T2	6	0	6
T3	11	10	21
<b>Nodalstatus</b>			
N0	24	20	44
N1	1	0	1
NX	1	0	1
<b>Metastasen</b>			
M0	16	19	35
M1	10	1	11
<b>Veneninvasion</b>			
V0	14	14	28
V1	12	6	18
<b>Grading</b>			
G1	1	5	6
G2	25	14	39
G3	0	1	1
<b>Tumor-Größe</b>			
0-5	7	14	21
5,1-7	10	5	15
7,1-9	5	0	5
9,1-12	3	0	3
12,1-X	1	1	2

**Tab. 6: Klinisch-pathologische Parameter der Nierenzellkarzinom-Patienten**

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die klinisch-pathologischen Parameter des untersuchten Patientenkollektivs.

### **2.2.2 Isolierung von RNA aus Makrodissektions-Gefriergewebe**

Das PureLink™ RNA Mini Kit von Invitrogen ermöglichte in Kombination mit TRIzol® Reagenz die Lyse und die maximale Ausbeute an gesamt RNA aus Gewebsproben, deren Aufreinigung über Silica-Säulen erfolgte. Die Gefriergewebsproben aus Makrodissektionsschnitten der Universität Bonn wurden in der angeschlossenen Pathologie sezziert, 5 µm dünne Schnitte mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt und bewertet. Vom Tumorareal und Normalgewebe (möglichst tumorfern entnommen) des selben Patienten wurden ca. zehn 20 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und in einem Eppendorfgefäß mit 1 ml TRIzol® zur Phasentrennung versetzt. Nach 5 minütiger Inkubationszeit und mehrfachem Aufsaugen in der Pipette wurden 0,2 ml Chloroform beigemischt und für 2-3 Minuten inkubiert. Im Anschluss fand eine Zentrifugation bei 4 °C für 15 Minuten bei 12000 g statt. Nach Oberschicht Transfer von 400 µl in ein neues Reaktionsgefäß wurde ein gleicher Teil 70 %iger Ethanollösung beigemischt und gevortext. Hohe konglomerierte RNA Konzentrationen wurden durch Schütteln wieder in Lösung gebracht. 700 µl dieser Lösung wurden auf eine Filtersäule gegeben und bei Raumtemperatur für 15 Sekunden bei 12000 g zentrifugiert, der Durchfluss im Anschluss verworfen und mit den verbleibenden 100 µl das Gleiche vollzogen. 700 µl Wasch Puffer I wurden auf die Säule gegeben, erneut zentrifugiert und verworfen. Daraufhin wurden zweimal 500 µl Wasch Puffer II aufgebracht und der Durchfluss entsorgt. Die Membran wurde durch 1 minütiges Zentrifugieren getrocknet und der Filtereinsatz in ein Recovery Tube überführt. Im Anschluss wurden zweimalig je 50 µl Rnase-freies Wasser aufgebracht und durch Zentrifugation (2 Minuten für 12000 g) die RNA vollständig von dem Filtereinsatz abgelöst. Die isolierte RNA konnte bei -80 °C konserviert werden.

### **2.2.3 Isolierung von RNA aus Laser-Mikrodissektionsschnitten**

Die Laser-Mikrodissektionsschnitte der aus Erlangen gelieferten Gefriergewebsproben wurden anders verarbeitet als im PureLink™ RNA Mini Kit von Invitrogen vorgesehen,

da die Proben schon mit 200 µl TRIzol versetzt geliefert worden waren. Durch Zufügen von zusätzlichen 300 µl TRIzol wurde ein Gesamtvolumen von 0,5 ml erreicht. Durch wiederholtes Aspirieren und Auspressen mit einer 1ml Spritze konnte das Zellmaterial zerkleinert, gelöst und weiter verarbeitet werden. Gemäß den erforderlichen Mengenverhältnissen wurden 100 µl Chloroform zugefügt und die Zentrifuge für 15 Minuten auf 4 °C bei 12.000 Umdrehungen zur Phasentrennung gestartet. Im Anschluss konnten dann 200 µl der obersten Phase abgenommen und mit der gleichen Menge an 70 %igen Ethanol aufgefüllt werden. Die Waschvorgänge entsprachen denen der Bonner Zellkulturen. Zur Elution der Proben wurden aufgrund der geringeren RNA-Konzentrationen die Volumina des RNA-freien-Wassers auf eine Gesamtmenge von 25 µl verringert. So wurden im ersten Schritt 25 µl auf die Waschsäule gegeben und für 2 Minuten zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Anschließend wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.4 Isolierung von RNA zur Primeretablierung**

Die Zelllinie CAKI II eines 69-jährigen Patienten mit Nierenzellkarzinom wurde zur Primeroptimierung verwendet. Das Material, erhalten von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Deutschland), wurde nach Herstellervorschrift in RPMI 1640 in 10 % fetalem Kälberserum und 35 U/ml Penicillin/Streptomycin bei 37 °C, sowie bei 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchte kultiviert. Vor Isolierung der RNA wurden die Zellen in PBS gewaschen. Nach Absaugen dieser Lösung wurde eine bedeckende Fläche Trypsin aufgebracht und für 5 Minuten inkubiert um eine Zellablösung von der Gefäßwand hervorzurufen. Eine gleiche Menge Medium, beendete die Trypsin Wirkung und schützte die verbliebenen Zellen. Nach Zentrifugation eines Abnehmeröhrchens konnte der Mittelwert der Zellzahl mit Hilfe eines Zählquadrates unter dem Mikroskop ermittelt und eine Menge von  $5 \times 10^6$  Zellen isoliert werden. Diese Zellsuspension wurde für 2 Minuten bei 5000 g zentrifugiert und das Zellpellet bei -80 °C gelagert. Die folgenden RNA-Aufreinigungsschritte und cDNA Umschreibung erfolgten im gleichen Verfahren, das auch bei den Bonner-Gefriergewebsproben angewendet worden war. Nach Aufreinigung dieser Zellprobe

wurde eine PCR mit den vorliegenden Primern durchgeführt. Dazu wurden die Proben cDNA in einer Konzentration von 37,5 ng/µl zehnfach verdünnt.

### **2.2.5 RNA-Konzentrationsmessung**

Mit dem Spectrophotometer ND-1000 von Peqlab können die Konzentrationen der isolierten RNA Proben anhand der Wellenlänge 260 nm gemessen werden. In dieser Messung können außerdem Proteine mit einer Wellenlänge von 280 nm, sowie Trübungen mit 230 nm unterschieden werden. RNase freies Wasser diente zur Kalibrierung („Blanken“) des Gerätes. Im Anschluss wurden dann je 2 µl des Probenmaterials aufpipetiert und gemessen. Die Konzentration wird über die gemessene optische Dichte bei 260 nm mit dem RNA-Faktor 40 ng/µl berechnet. Für die Reinheitsprüfung wird das Adsorptionsverhältnis von 260 nm/280 nm gebildet. Dieses sollte für reine RNA nahezu 2.0 sein.

### **2.2.6 RNA-cDNA Umschreibung**

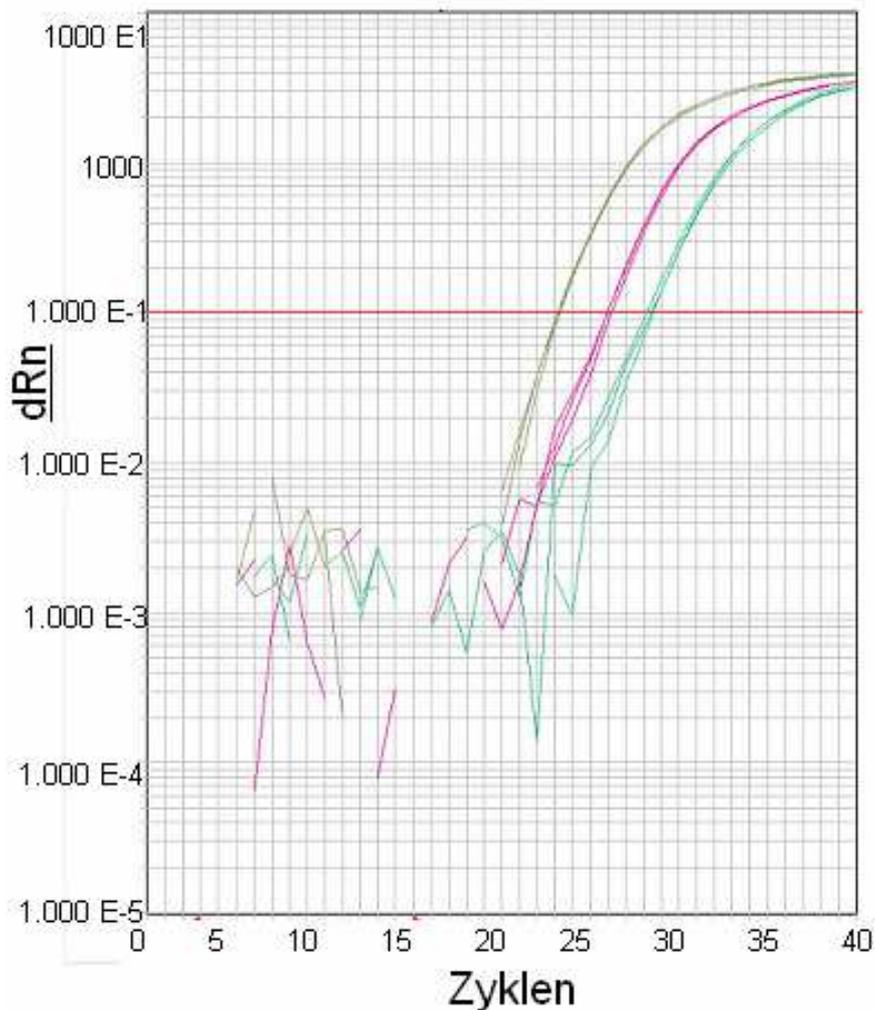
Zur Umschreibung von RNA in cDNA wurde das SuperScript™ III First-Strand Synthesis Super Mix für qRT-PCR von Invitrogen genutzt. Dieses Kit ermöglicht die Synthese von einsträngiger cDNA, die später für eine quantitative Real-Time PCR genutzt werden kann. Es enthält eine Reverse Transkriptase, mit geringer RNase H Aktivität und langer thermischer Stabilität, was eine hohe cDNA Ausbeute und gute Produktqualität gewährleistet. Sie kann in einem Temperaturbereich von 42-60 °C wirken. Die RNaseOUT, ein rekombinanter Ribonukleasehemmer, verhindert den Abbau der RNA. Als Umschreibepriemer verwendeten wir die im Kit enthaltenen Oligo(dT) 20 Primer und Random Hexamere. Des Weiteren befindet sich eine E.coli RNase H in diesem Kit, welche das RNA-Template von cDNA:RNA Hybridmolekülen zu befreien vermag. Um größere Mengen RNA verarbeiten zu können wurde ein Master Mix angelegt, welches abhängig vom Probenmaterial verschieden zusammengesetzt war. Für alle Proben wurden, wenn möglich, pro Reaktion eine RNA Menge von 500 ng auf 8 µl eingesetzt. Durch die Zugabe von 10 µl Reaktionslösung und 2 µl RT-Enzym wurde ein

Endvolumen von 20 µl erreicht. Im Thermocycler (UNO-Thermoblock, Biometra) wurde die Umschreibung für alle Proben mit folgendem Programm gefahren. Anfangs wurde für 10 Minuten bei 25 °C inkubiert. Dann wurde für 30 Minuten auf 50 °C aufgeheizt und für weitere 5 Minuten bei 85 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben auf 4 °C herunter gekühlt und 1 µl E.coli Rnase-H hinzugefügt bevor abschließend für 20 min bei 37 °C inkubiert wurde. Diese Lösung wurde, wenn die Konzentration es ermöglichte, mit DEPC behandeltem Wasser auf 5 ng/µl cDNA verdünnt und bei -20 °C portioniert gelagert.

## **2.3 Polymerasekettenreaktion**

### **2.3.1 Quantitative PCR**

Eine PCR ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung von bestimmten DNA-Sequenzen. Dazu werden ein Forward- und ein Reverse-Primer eingesetzt, die die Zielsequenz eingrenzen. Zusätzlich werden zum Reaktionsansatz eine hitzestabile DNA-Polymerase, Nukleotide und Pufferlösungen dazugegeben. Eine PCR umfasst 40 Zyklen, welche aus jeweils 3 Arbeitsschritten bestehen. Anfangs wird die doppelsträngige DNA denaturiert, indem sie auf 95 °C erhitzt wird und sich zwei Einzelstränge bilden. Durch ein Absenken der Temperatur auf ca. 60 °C lagern sich die Primer, an den für sie komplementären Basensequenzen der Einzelstränge, an („Annealing“). Die beigefügte DNA-Polymerase baut dann freie Nukleotide an das 3`-Ende des Primers an, was zur Elongation führt. Bei der quantitativen Real-Time PCR wird bei jedem Zyklus die DNA Menge mit einem Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green I) gemessen. Dieser Farbstoff lagert sich in doppelsträngige DNA ein, die während der Elongation neu entsteht. Bei jedem Zyklus verdoppelt sich das PCR-Produkt, entsprechend steigert sich die Fluoreszenz. In Abb.1 lässt sich die Zunahme des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der Anzahl durchlaufener PCR-Zyklen ablesen. Die waagerechte Linie stellt den so genannten Threshold dar. Ab diesem Punkt grenzt sich das PCR Produkt von der Hintergrundfluoreszenz ab.

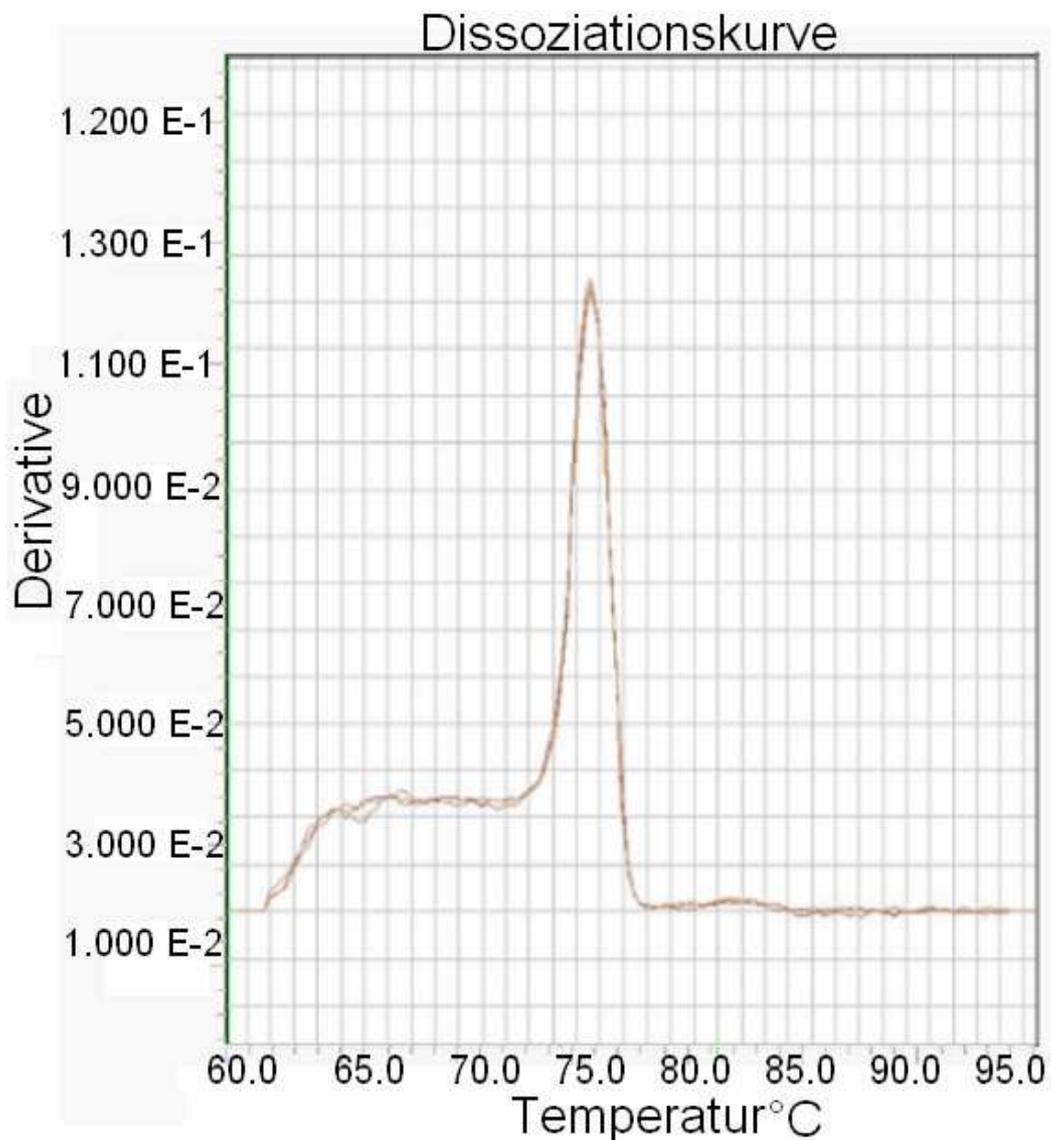


**Abb. 1: Polymerasekettenreaktion**

Darstellung einer Polymerasekettenreaktion (PCR) dreier unterschiedlicher Proben, jeweils in Dreifachbestimmung; die waagerechte Linie stellt den so genannten Cycle-Threshold dar, ab dem das Signal des PCR-Produkts von der Hintergrundfluoreszenz abgegrenzt werden kann. Auf der Abszisse ist die Anzahl durchlaufener PCR-Zyklen aufgeführt, die Ordinate gibt die Höhe des detektierten Fluoreszenzsignals ( $\Delta R_n$ ) in logarithmischer Skalierung wieder.

Zur quantitativen Bestimmung der PCR Produkte wird der Ct-Wert genutzt. Dieser Wert beschreibt den Zyklus, in dem die Farbintensität erstmalig signifikant über der Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Zur Überprüfung der Spezifität des entstandenen PCR-Produkts wird im Anschluss der 40 Zyklen eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Temperatur wird kontinuierlich erhöht und gleichzeitig die Fluoreszenz gemessen. Die Schmelztemperatur entspricht der Temperatur, bei der die DNA Doppelstränge in die Einzelstränge zerfallen und die Fluoreszenz schlagartig abnimmt. Abb. 2 zeigt exemplarisch eine solche Schmelz- bzw. Dissoziationskurve.

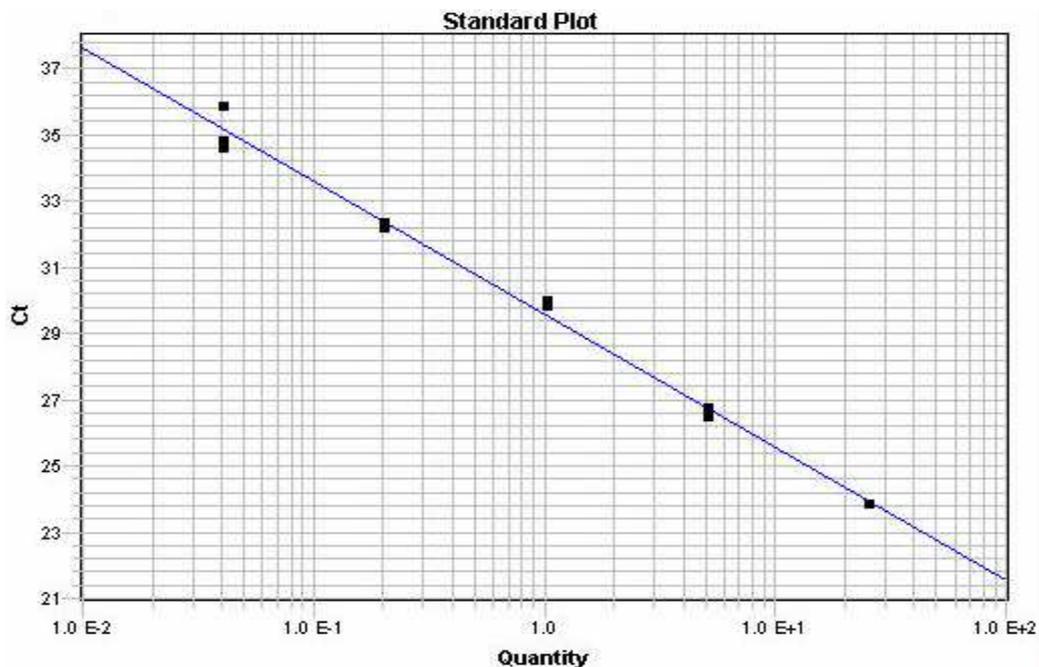
Für die Schmelztemperatur spielen die Produktgröße und die Sequenz eine wichtige Rolle, denn lange PCR-Produkte schmelzen, genauso wie Guanin-Cytosin reiche Produkte, später. Die noch im Reaktionsansatz enthaltenen Primer Dimere schmelzen aufgrund ihrer geringeren Basenpaarlänge schon bei niedrigeren Temperaturen und können dadurch leicht von den gezielt amplifizierten PCR Produkten abgegrenzt werden.



**Abb. 2: Schmelzkurvenanalyse**

Dargestellt sind die nahezu deckungsgleichen Schmelzkurven (Dissoziationskurven) dreier getrennter Bestimmungen derselben Probe. Auf der Ordinate wird die Ableitung der Fluoreszenzunterschiede zu den Temperaturunterschieden dargestellt. Auf der Abszisse ist die Temperatur aufgeführt.

Zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Reagenzien und um etwaige Kontaminationen des PCR-Ansatzes auszuschließen wurden auch Proben ohne DNA Zusatz („No-Template-Control“) untersucht. Zusätzlich wurde eine Kalibrator Eichkurve mit 5 Verdünnungsstufen aus der Nierenkarzinom Zelllinie CAKI-II erstellt. Anhand dieser gewonnenen Werte kann mithilfe der Steilheit der Eichgeraden, dem Slope, die Effizienz der PCR errechnet werden. Die Eichgerade, welche mit Proben definierter cDNA-Konzentration der Zelllinie CAKI-II erstellt wurde ist in Abb. 3 dargestellt.



**Abb. 3: Standardgerade**

Dargestellt ist die Eichgerade der Zelllinie CAKI-II, die mittels linearer Regression anhand von Proben definierter komplementärer Desoxyribonukleinsäure-Konzentrationen erstellt wurde.

Das in dieser Studie angewendete SYBR<sup>®</sup> GreenER<sup>™</sup> qPCR SuperMix for ABI Prism<sup>®</sup> ist eine vorgefertigte Mischung für eine quantitative Real-Time PCR, allerdings ohne Primer und Template. Sie liefert eine exzellente Sensitivität in der Zielsequenz-quantifizierung und bindet proportional zur DNA Konzentration fluoreszierende Farbe in die Doppel-Helix ein. Die Hot Start Taq-DNA Polymerase wurde chemisch modifiziert, sodass sie auch bei niedrigen Temperaturen inaktiv ist und die PCR Reaktion bei Raumtemperatur vorbereitet werden kann. Durch die Verwendung von UDG (Uracil-DNA-Glykosylase) und dUTP (Desoxyuridin Triphosphat) soll die Reamplifikation von eventuell verschleppten PCR Produkten zwischen den Reaktionen verhindert werden.

Durch die Verwendung von dUTP werden die neu entstandenen DNA-Fragmente vorheriger PCRs für eine Hydrolyse durch UDG sensibilisiert. Diese Hydrolyse wird bei 50 °C vor der eigentlichen PCR durchgeführt und die UDG selbst wird später durch die hohen Temperaturen bei der Hot Start Aktivierung zerstört. ROX dient der Normalisierung des Fluoreszenz Signals der Dreifachbestimmungen einer Probe als unabhängiges Reporterfärbemittel. Die PCR Messung wurde in einem 10 µl Ansatz als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die jeweiligen Teilvolumina des PCR-Reaktionsansatzes sind in Tab. 7 aufgelistet.

---

Teilvolumina des 10 µl PCR- Reaktionsansatzes

QPCR-Mix	Probe	Primer fw.	Primer rev.	Wasser	Gesamt
5 µl	1 µl	0,3 µl	0,3 µl	3,4 µl	10 µl

---

**Tab. 7: Teilvolumina des 10µl PCR- Reaktionsansatzes**

Die Tabelle zeigt die Teilvolumina der zur Polymerasekettenreaktion eingesetzten Reaktionspartner.

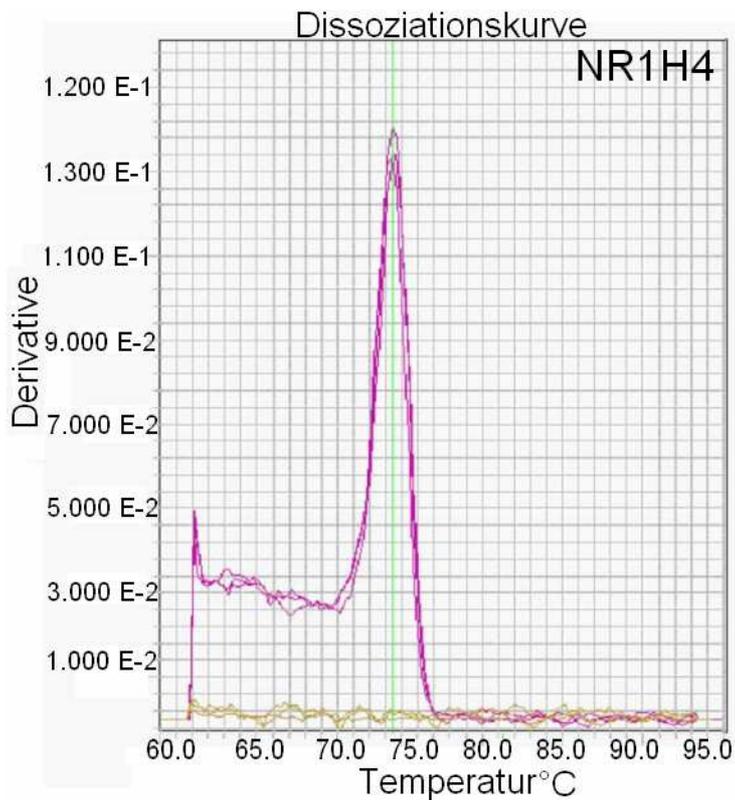
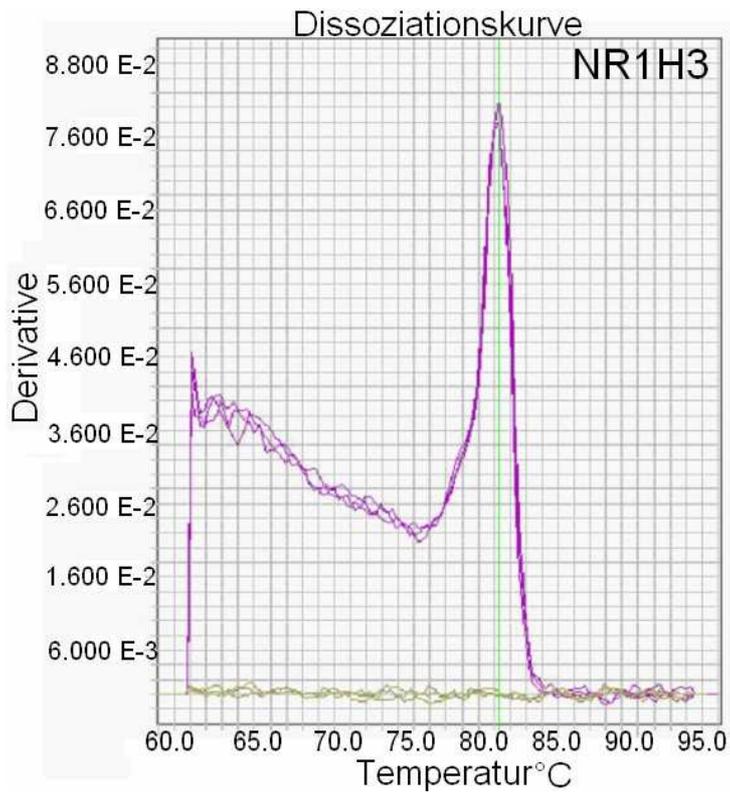
Das Temperaturprofil im 7900 HT Real-Time PCR System begann für 2 min. bei 50 °C und diente der UDG Inkubation. Danach wurde die Temperatur auf 95 °C erhöht und für 10 Minuten gehalten, wodurch die UDG inaktiviert und die DNA Polymerase aktiviert wurde. Dies wird als Hot Start bezeichnet. Daraufhin starteten 40 Zyklen in denen abwechselnd für 15 Sekunden eine Denaturierung bei 95 °C erfolgte. Anschließend wurde die Temperatur für 60 Sekunden auf 60 °C gehalten, um das Annealing und die Elongation zu ermöglichen.

Die PCR wurde folgendermaßen eingestellt:

UDG Inkubation	50°C	2 min
Enzym Aktivierung	95°C	10 min
40 Zyklen von		
Denaturierung	95°C	00:15 min
Anealing/Elongation	60°C	1 min

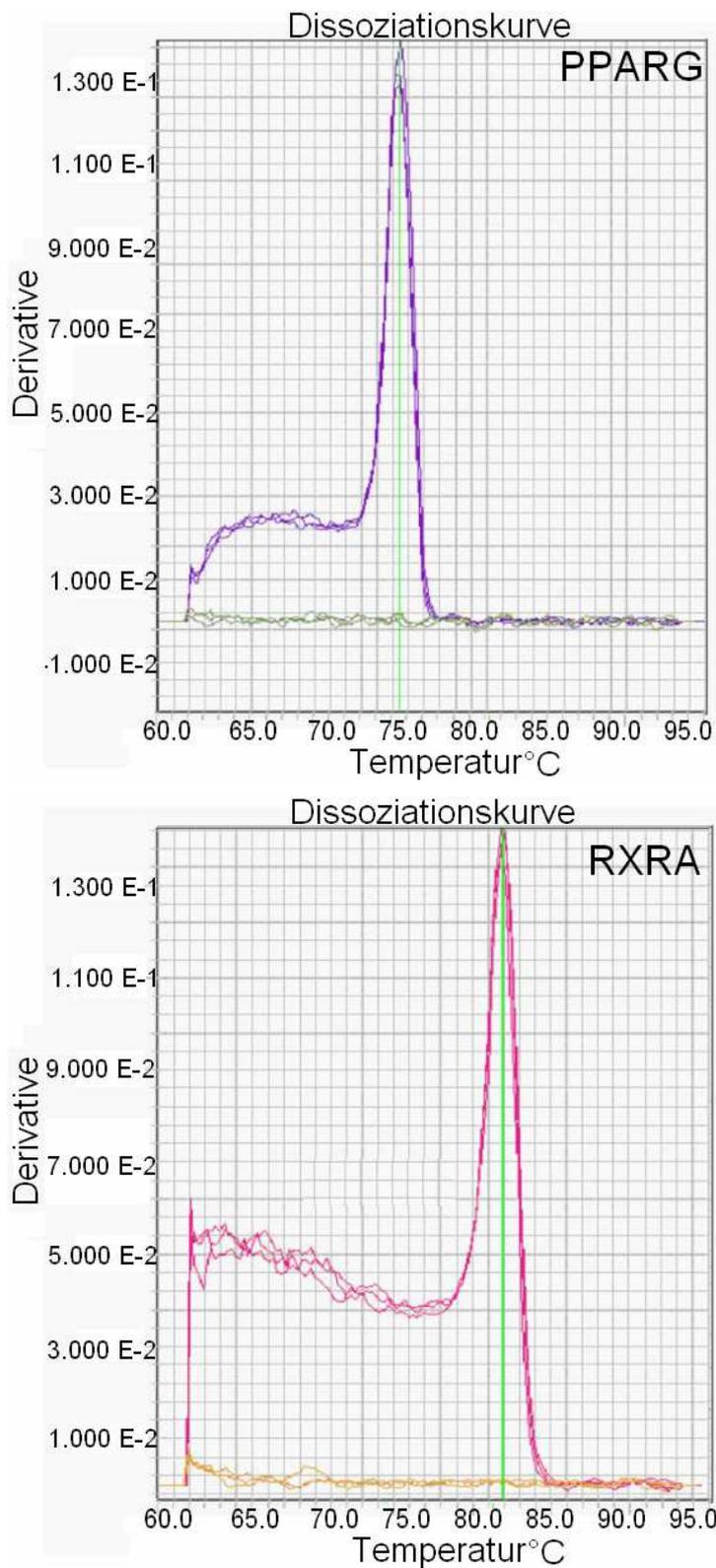
### 2.3.2 Primer Etablierung

Zur Etablierung der Primer wurde die Zelllinie CAKI-II (humanes Nierenzellkarzinom) als Positivkontrolle für die Studie gewählt, da diese von allen verwendeten Primern in ausreichenden und vergleichbaren Mengen amplifiziert wurde. Die cDNA Umschreibung wurde wie unter Punkt 2.2.4 beschrieben durchgeführt. Nach Durchführung der PCR konnten die Primer folgendermaßen bewertet werden: Die No-Template-Control war für alle Primer negativ. Die Schmelzkurven enthielten einen homogenen Peak von nur einem PCR-Produkt (siehe Tab. 8). In Abb. 4 und Abb.5 sind die Schmelzkurven der PCR-Produkte, der in dieser Studie verwendeten Primer dargestellt. Die oben aufgelisteten Primer bewiesen ihre volle Funktionstüchtigkeit und standen für die weiteren Versuche bereit.



**Abb. 4: Schmelzkurven der PCR-Produkte von NR1H3 und NR1H4**

Dargestellt sind die Schmelzkurven der PCR-Produkte, der in dieser Studie verwendeten Primer NR1H3, NR1H4 (von oben). Auf der Ordinate wird die Ableitung der Fluoreszenzunterschiede zu den Temperaturunterschieden dargestellt. Die exakten Schmelzpunkttemperaturen können auf der Abszisse abgelesen werden.



**Abb. 5: Schmelzkurven der PCR-Produkte von PPARG und RXRA**

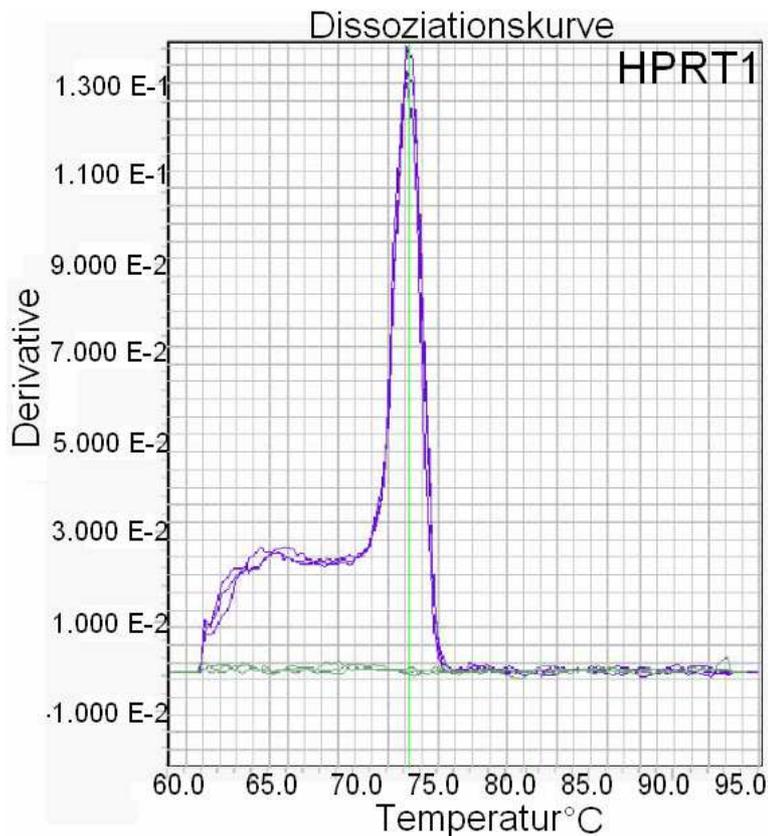
Dargestellt sind die Schmelzkurven der PCR-Produkte, der in dieser Studie verwendeten Primer PPARG, RXRA (von oben). Auf der Ordinate wird die Ableitung der Fluoreszenzunterschiede zu den Temperaturunterschieden dargestellt. Die exakten Schmelzpunktemperaturen können auf der Abszisse abgelesen werden.

NR1H3-I:	81,2°C	NR1H4-II:	74,4°C
PPARG-II:	75,4°C	RXRA-II:	81,9°C

**Tab. 8: Schmelzpunkte der Primer**

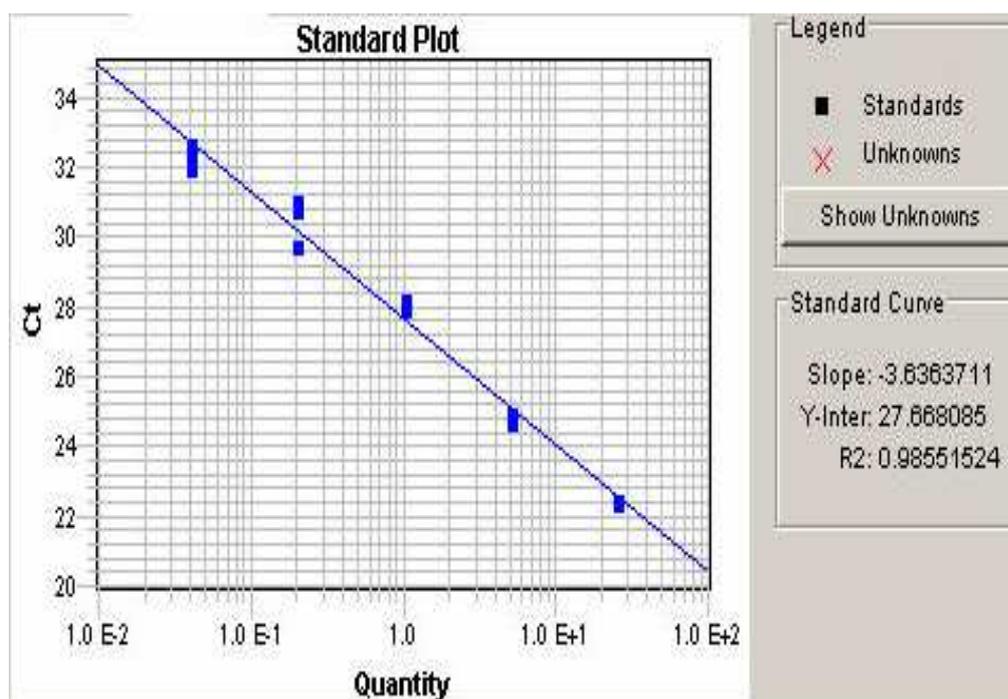
Aufgelistet sind die Schmelztemperaturen der in dieser Studie verwendeten Primer. Die hohen Schmelztemperaturen beweisen eine große Primerstabilität und bilden die Grundlage für ein erfolgreiches Experiment.

Vergleichbar gute Ergebnisse konnten auch mit dem Housekeeper HPRT1 erzielt werden. Dieser besaß einen Schmelzpunkt von 74,2°C, sowie eine Effizienz von circa 88 % (siehe Abb. 6 und Abb. 7).



**Abb. 6: Schmelzkurve HPRT1**

Dargestellt ist die Schmelzkurve (Dissoziationskurve) des Polymerasekettenreaktionsprodukts, des in dieser Studie verwendeten Housekeepergens HPRT1. Auf der Ordinate ist die Ableitung der Fluoreszenzunterschiede zu den Temperaturunterschieden abgebildet. Die exakte Schmelzpunkttemperatur ist auf der Abszisse markiert.



**Abb. 7: Effizienz HPRT1**

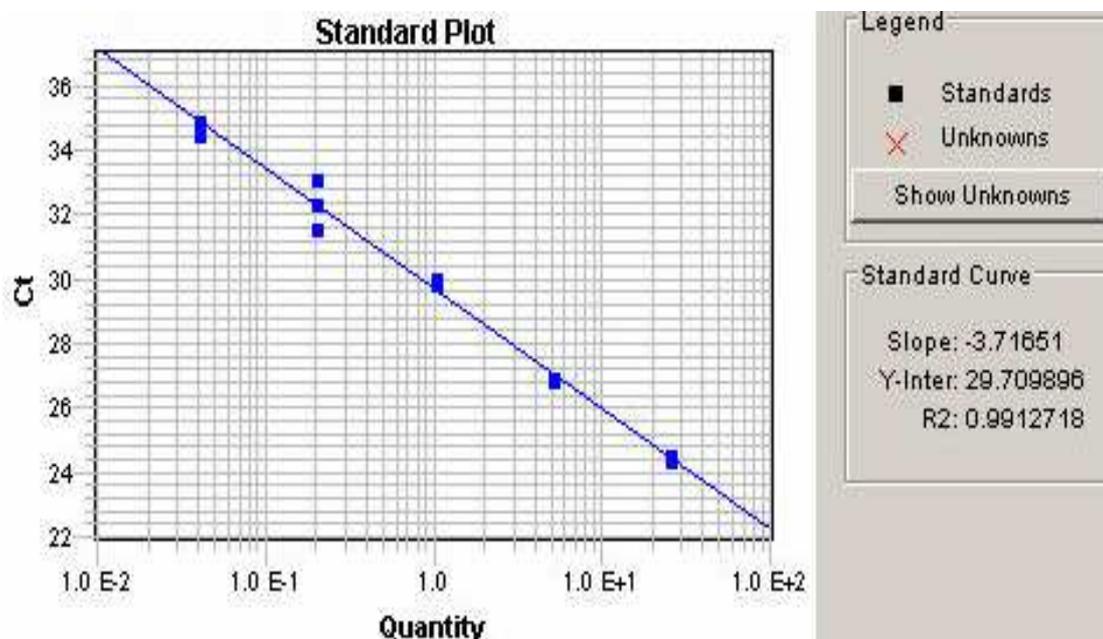
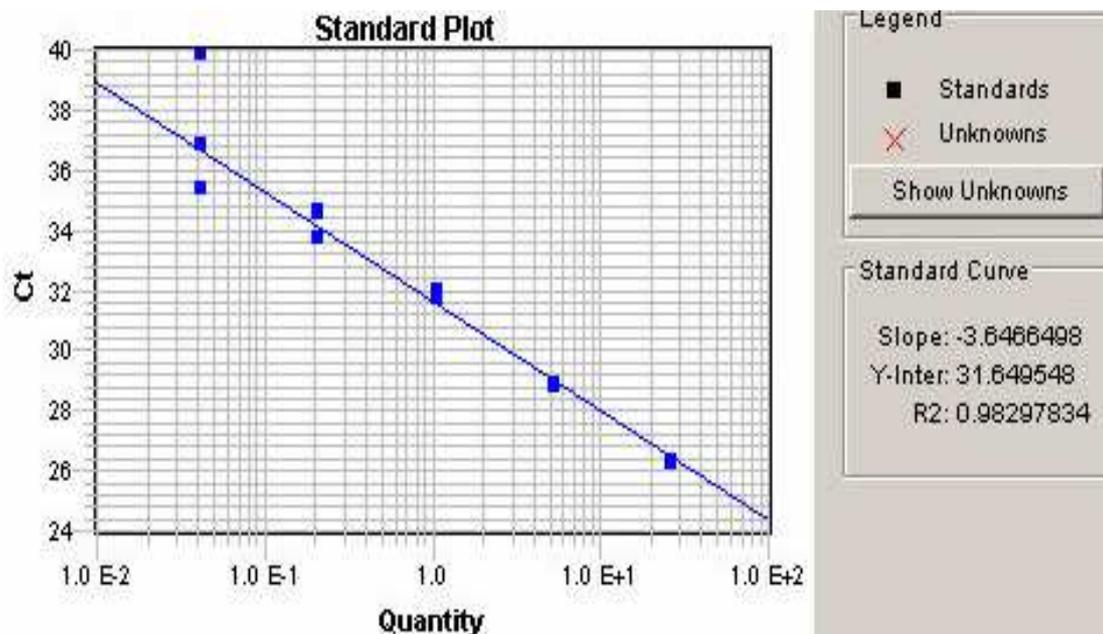
Dargestellt ist die Eichkurve des Housekeepergens HPRT1. Auf der Ordinate ist der Cycle Threshold (Ct-Wert) aufgeführt, der den Anfang des exponentiellen Wachstums signalisiert. Die Abszisse gibt Aufschluss über die Menge des amplifizierten Produkts. Der aus der Steigung des Graphen abgeleitete negative Slope wird zur Berechnung der Effizienz herangezogen.

Mit Hilfe einer Standardverdünnungskurve aus CAKI-II wurden die Effizienzen der jeweiligen Primer errechnet. Der Faktor 2 entspricht in der Theorie einer 100%igen Verdopplung des Ausgangsproduktes bei jedem PCR Zyklus. Die detaillierte Rechenformel ist unter Punkt 2.4 ausgeführt. In der Praxis wird allerdings selten eine exakte Verdopplung der Amplifikate erreicht. Die in dieser Studie verwendeten Primer zeigten Effizienzen von ca. 85% (siehe Tab.9, sowie Abb. 8 und Abb. 9).

Primer	Effizienz
HPRT1	1,8836465 (88 %)
NR1H3-I	1,8802577 (88 %)
NR1H4-II	1,8607842 (86 %)
PPARG-II	1,7738664 (77 %)
RXRA-II	1,8043517 (80 %)

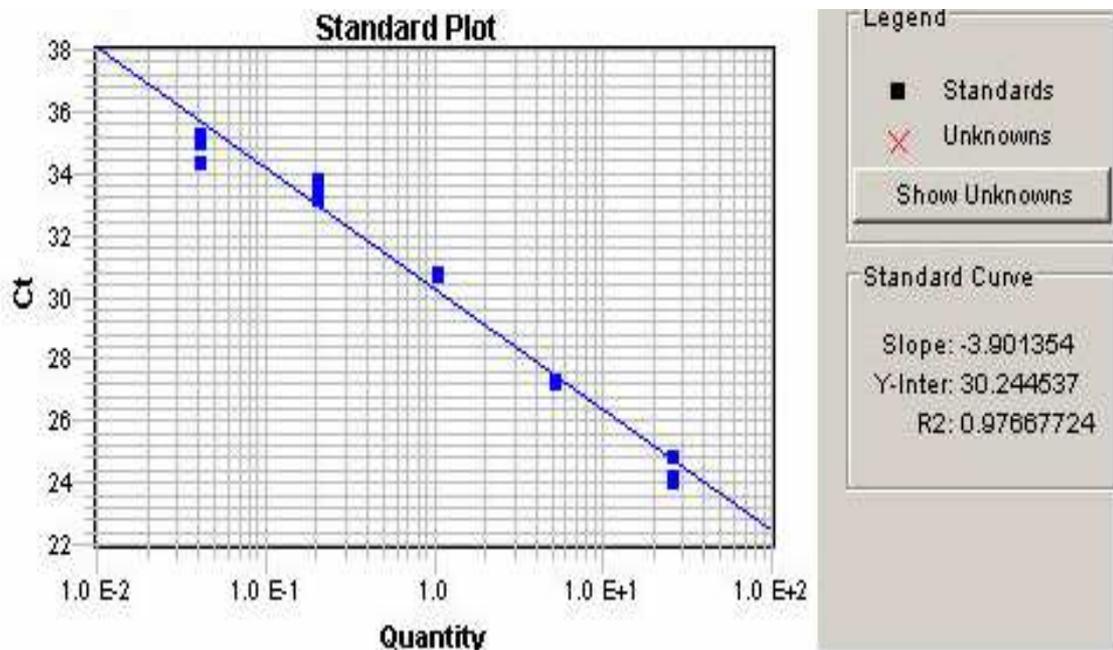
**Tab. 9: Primereffizienzen**

Die Tabelle zeigt die in der Praxis erreichten Genexpressionslevel (Effizienz) der jeweiligen Primer.



**Abb. 8: Effizienzen NR1H3 und NR1H4**

Die in der Abbildung aufgeführten Graphen zeigen die Eichkurven der untersuchten Primer NR1H3 und NR1H4 (von oben). Auf der Ordinate ist der Cycle Threshold (Ct-Wert) aufgeführt, der den Anfang des exponentiellen Wachstums signalisiert. Die Abszisse gibt Aufschluss über die Menge des amplifizierten Produkts. Über die Steigung (Slope) der Eichkurven kann die Effizienz der Primer ermittelt werden.

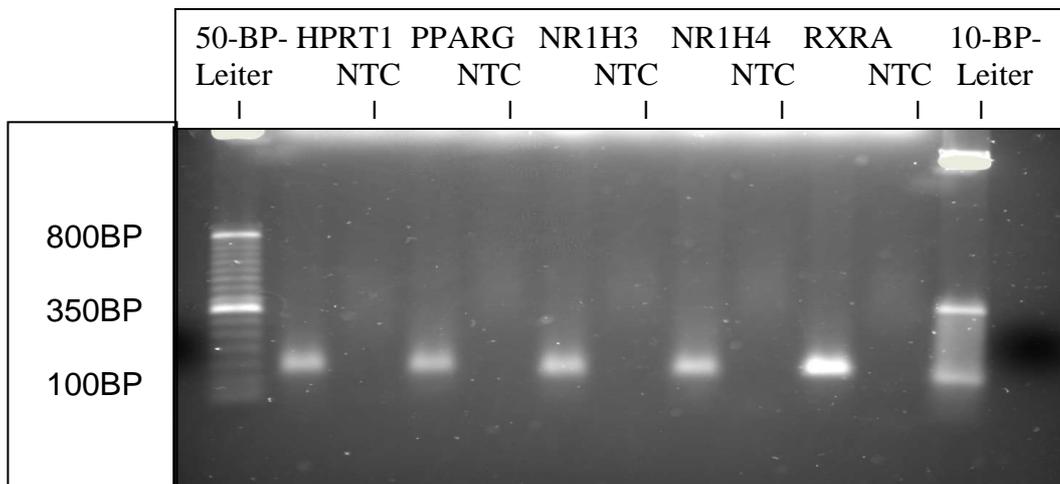


**Abb. 9: Effizienzen PPARG und RXRA**

Die in der Abbildung aufgeführten Graphen zeigen die Eichkurven der untersuchten Primer PPARG und RXRA (von oben). Auf der Ordinate ist der Cycle Threshold (Ct-Wert) aufgeführt, der den Anfang des exponentiellen Wachstums signalisiert. Die Abszisse gibt Aufschluss über die Menge des amplifizierten Produkts. Über die Steigung (Slope) der Eichkurven kann die Effizienz der Primer ermittelt werden.

### 2.3.3 Gelelektrophorese

Mit Hilfe einer Gelelektrophorese kann die Größe der amplifizierten PCR-Produkte ermittelt und der erfolgreiche Ablauf der PCR bewertet werden. Zur Durchführung wurde ein 2 % Agarosegel hergestellt. Dazu wurde die Agarose in 1x TBE aufgekocht; mit 1x SYBR<sup>®</sup> Safe DNA Gel Stain von Invitrogen versetzt und danach in einem horizontalen Gelgießstand gefüllt. Zu 20 µl PCR-Produkt wurden 4 µl 6x Ladepuffer gegeben. Als Leitern wurden 10 und 50 Basenpaarleitern von Invitrogen verwendet, die vorher mit dem Ladepuffer gemischt wurden. Die Gelelektrophorese wurde dann mit 1x TBE als Laufpuffer bei 100V für 60 min durchgeführt. Mit Hilfe einer UV-Lampe konnte man die DNA-Fragmente darstellen und fotografieren. Die Primer zeigten zufrieden stellende Ergebnisse: Es fand sich keine Bande bei der No-Template-Control (NTC) und definierte Banden in der erwarteten Basenpaargröße (siehe Abb. 10).



**Abb. 10: Gelelektrophorese**

Abgebildet sind die in dieser Studie untersuchten Polymerasekettenreaktionsprodukte (PCR-Produkte) für HPRT1 und den nukleären Rezeptoren PPARG, NR1H3, NR1H4, RXRA (v.l.) mit je einer „No-Template-Control“ (NTC) sowie einer 50- und einer 10 Basenpaarleiter (v.l.). Die Aufhellungen (Banden) stellen Desoxyribonukleinsäure-Fragmente dar, die mit Hilfe einer UV-Lampe sichtbar gemacht wurden. Die in dieser Abbildung gezeigten PCR-Produkte besitzen jeweils eine Basenpaarlänge von ungefähr 100 Basenpaaren (BP).

## 2.4 Berechnung und Quantifizierung der Messergebnisse

In dieser Studie wurden nicht die absoluten Startkopienzahlen oder -konzentrationen bestimmt, sondern die Expression des Zielgens auf ein zweites, ubiquitär und homogen exprimiertes Gen bezogen. Dazu verwendete ich das Referenzgen (Housekeepergen) HPRT1, welches diese Voraussetzungen unabhängig von der Fragestellung bei Tumoralen auch bei Normalgewebe erfüllte (De Kok, J. B. et al, 2005). Anschließend wurde eine Normalisierung mit Hilfe eines Kalibrators durchgeführt. Relativierte, normalisierte Werte bieten den Vorteil, dass die Varianz der Expressionsergebnisse reduziert wird, da mögliche Gewebe- und Matrixeffekte, oder unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen, sowie Fehler bei der Reversen Transkriptase innerhalb einer Probe gleichermaßen das Zielgen und das Housekeepergen betreffen. Diese individuellen Probeneffekte konnten dadurch aufgehoben werden. Mit Hilfe einer angelegten Standardkurve ließ sich die Effizienz der PCR anhand der Steigung ermitteln. Bei einer Effizienz von 100 % würde in jedem Zyklus eine Verdopplung der Amplifikate stattfinden. Das ergibt eine Steigung  $\text{slope} = -3,32$ . Die Effizienz kann über folgende Formel berechnet werden:

$$E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$$

Für die in meiner Studie verwendete Standardkurve wählte ich Nierenmaterial von CAKI II, das wie schon erwähnt ein intensives Signal bei allen Primern lieferte. Es wurden zur Erstellung dieser Eichkurve vier Verdünnungsschritte durchgeführt.

STD 1: 25 ng/μl    STD 2: 5 ng/μl    STD 3: 1 ng/μl    STD 4: 0,2 ng/μl    STD 5: 0,04 ng/μl

Um die relativen Verhältnisse zu bestimmen wurden die Ct-Werte in folgende Rechenformel eingesetzt:

$$\text{Target-Gen/Referenz-Gen (Housekeeper)}$$

Anschließend wurde noch eine auf einen Kalibrator bezogene Normalisierung durchgeführt. Der Kalibrator stellte eine positive Vergleichsprobe dar, welche in einem stabilen Verhältnis von Target zum Referenzgen vorlag. Sie diente zur Normalisierung aller Proben innerhalb eines Laufs und als konstanter Kalibrierungspunkt, der zwischen

mehreren Läufen die unterschiedlichen Detektionssensitivitäten (Lauf-zu-Lauf-Unterschiede) korrigierte. Hierbei waren keine Standards erforderlich, da die relative Menge jedes Target und Referenzgens sowohl in der Target Probe als auch in der Vergleichsprobe (Kalibrator) bestimmt wurde. Die Ct-Werte liefern die Daten für die Kalkulation und wurden folgendermaßen ausgedrückt:

$$\frac{\frac{\text{Target- Gen}_{\text{Probe}}}{\text{Referenzgen}_{\text{Probe}}}}{\frac{\text{Target-Gen}_{\text{Calibrator}}}{\text{Referenzgen}_{\text{Calibrator}}}}$$

Die von uns genutzte Effizienz korrigierte Quantifizierung bezieht die die PCR-Effizienzen der jeweiligen Target- und Referenzgene mit ein. Sie stellt bis dato die genaueste Form der mRNA Quantifizierung dar. Berechnung des Expressionsunterschieds: Im 1. Schritt wurde relativiert und für jede Probe der Ct-Wert des Referenzgens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert.

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Referenzgen}$$

Im Anschluss wurde normalisiert, das heißt vom  $\Delta\text{Ct}$ -Wert der experimentell behandelten Proben der  $\Delta\text{Ct}$ -Wert der Kontrolle (Kalibrator) abgezogen.

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct Probe} - \Delta\text{Ct Kontrolle (Calibrator)}$$

Für die Umwandlung der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte in lineare Werte wird die arithmetische Formel:

$$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} \text{ verwendet}$$

Im verwendeten effizienzkorrigierten relativen Quantifizierungsmodell wurden anstelle der 2 (Verdopplung) die tatsächlich gemessenen Effizienzen (E) eingesetzt.

$$\text{Ratio} = \frac{(E \text{ Zielgen})^{\Delta\text{Ct}_{\text{Zielgen}}(\text{Kontrolle-Probe})}}{(E \text{ Referenzgen})^{\Delta\text{Ct}_{\text{Referenzgen}}(\text{Kontrolle-Probe})}}$$

### 2.4.1 Statistische Auswertung

Die bei dieser Studie erhaltenen Daten zur Expression von nukleären Rezeptoren, die histologischen Merkmale, sowie die klinisch-pathologischen Daten der Patienten wurden mit Hilfe der Software SPSS Version 18 ausgewertet. Zur Bewertung der Unterschiede beim Nierenzellkarzinom und in nicht-malignen Nierengeweben wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Die Korrelation innerhalb der klinischen Parameter und der histologischen Präparate wurde durch den Mann-Whitney-Test und durch den Kruskal-Wallis-Test erfasst. Die Signifikanz berechnet, ob die Unterschiede zwischen zwei Gruppen mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit und nicht durch Zufall zustande kommen und wird als p-Wert ausgedrückt. Ein Signifikanz-Wert von  $\leq 0,05$  gibt die Wahrscheinlichkeit, dass ein Unterschied der Mittelwerte zufällig ist, mit kleiner als 5 % an. Werte mit  $p \leq 0,05$  werden als „signifikant“ definiert.

### **3. Ergebnisse**

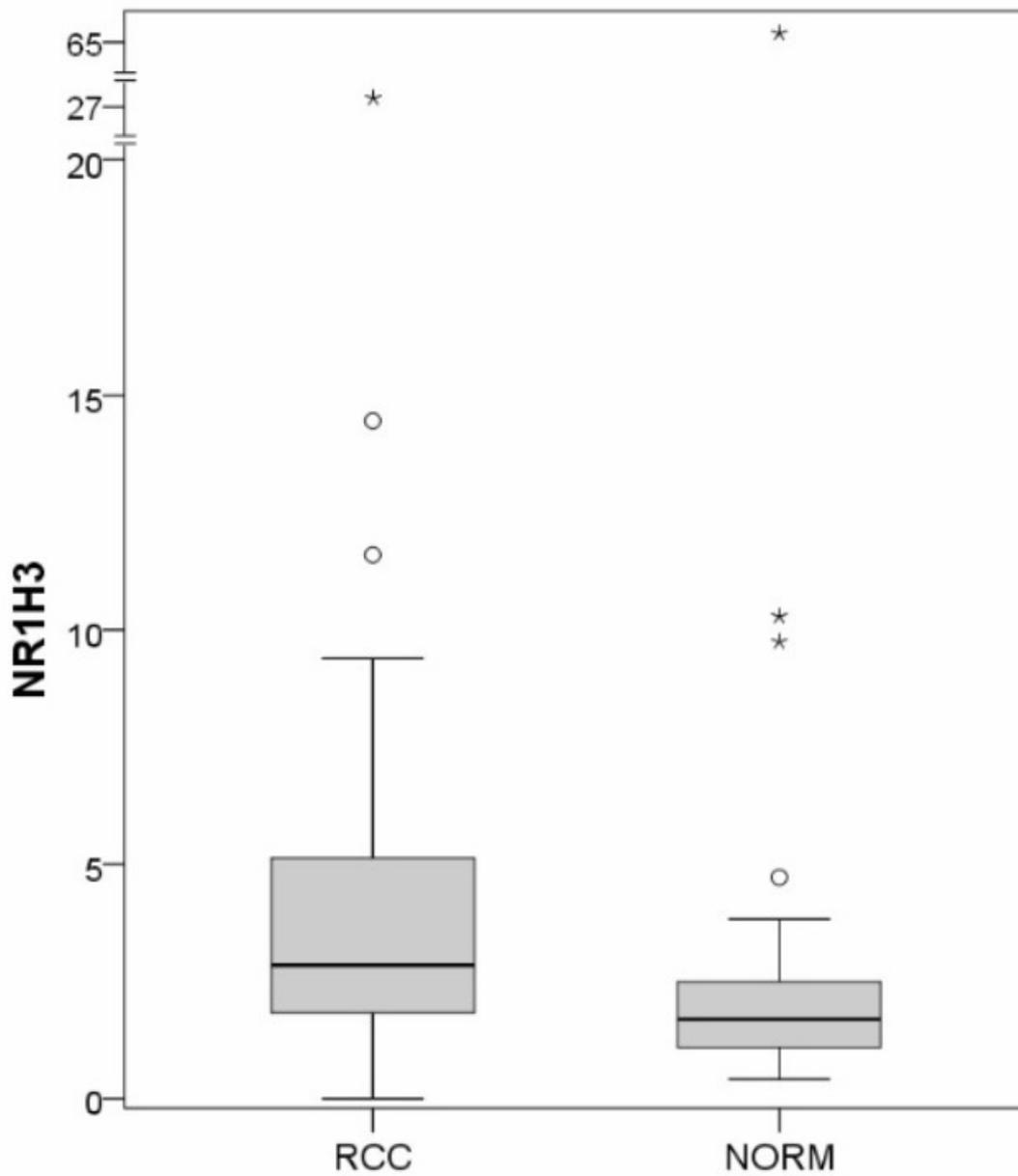
#### **3.1 *Nukleäre Rezeptoren in Nierenzellkarzinom und nicht malignen Gewebe***

Mit Hilfe des Wilcoxon-Tests wurden Tumor- und Normalgewebe miteinander verglichen. NR1H3 war mit  $p=0,002$  signifikant vermehrt exprimiert im Tumorgewebe. Beim Vergleich der Mittelwerte und der Mediane zeigte NR1H3 im Tumorgewebe einen Mittelwert von 4,403 und einen Median von 3,055. Im Normalgewebe stellte sich der Mittelwert mit 3,504 und der Median mit 1,650 dar. Ebenso war die NR1H4 Konzentration im Tumorgewebe signifikant erhöht ( $p<0,001$ ) bei einem Mittelwert von 5,172 und einem Median von 3,165. Im Normalgewebe fanden sich ein Mittelwert von 3,013 und ein Median von 1,500. Kein signifikanter Unterschied bestand bei der Expression von PPARG und RXRA in Tumor- und Normalgewebe. Gleiches ließ sich auch über die jeweiligen Mittelwerte und Mediane in Tumor- und Normalgewebe sagen. PPARG und RXRA waren tendenziell im Tumorgewebe hoch reguliert und zeigten somit die gleiche Tendenz wie NR1H3 und NR1H4, allerdings ohne statistische Relevanz. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Expression in Tumor- und Normalgewebe, der in der Studie untersuchten Primer sind in Tab. 10, sowie in den Abb. 11 bis 14 dargestellt.

	NR1H3	NR1H4	PPARG	RXRA
p-Werte	<b>0,002</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,258	0,312
Mittel-NO	3,504	3,013	2,806	1,583
Standart-NO	9,679	7,380	5,382	2,795
Median-NO	1,650	1,500	1,320	1,100
Range-NO	65,29	49,43	32,96	19,16
Mittel-TU	4,403	5,172	2,520	1,605
Standart-TU	4,631	4,776	2,499	1,445
Median-TU	3,055	3,165	1,685	1,260
Range-TU	27,14	23,88	12,71	8,140

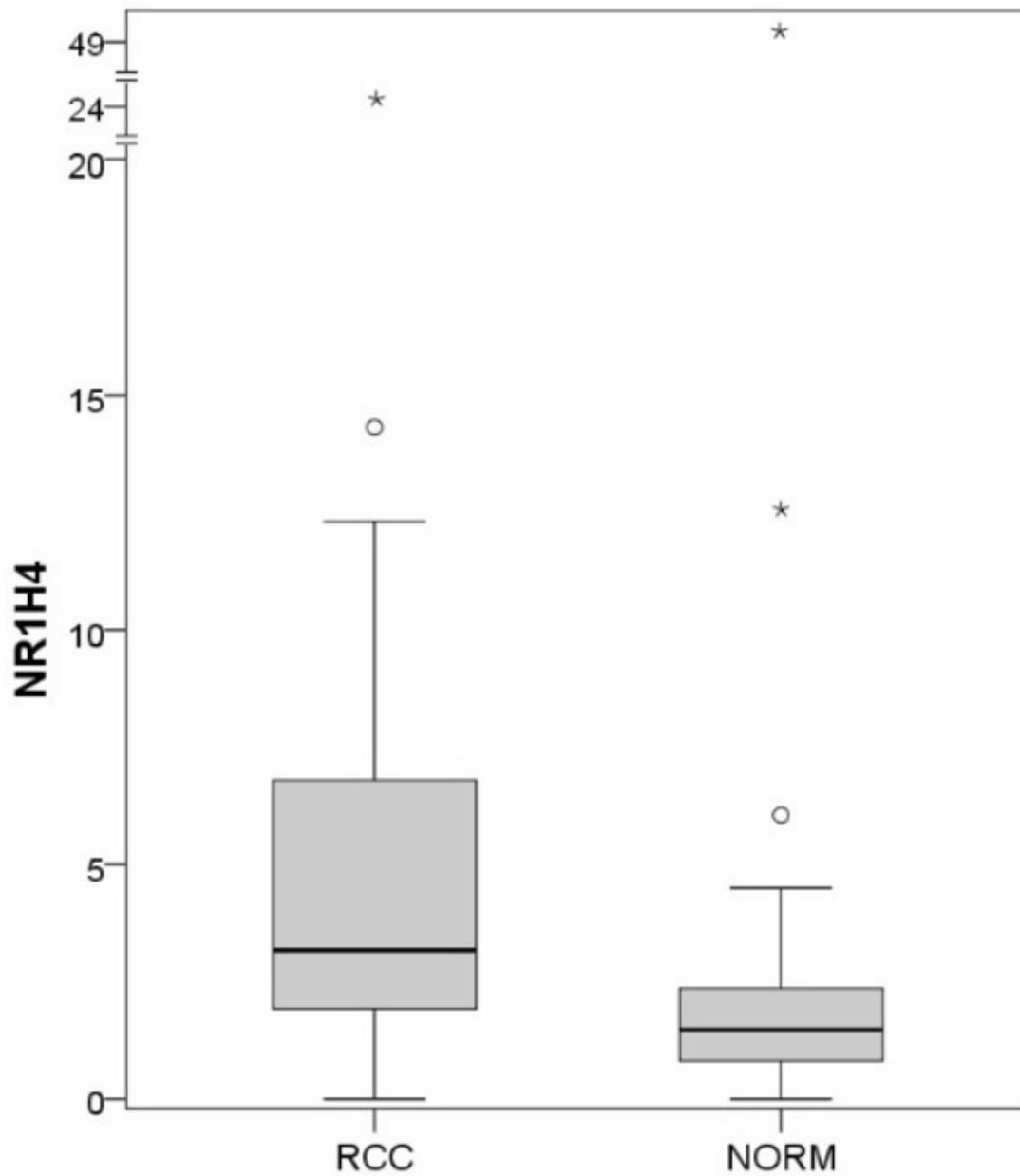
**Tab. 10: P-Werte, Mittelwerte, Standardabweichung, Mediane und Spannweite (Range) des Gesamtkollektivs:**

Die Tabelle zeigt die unterschiedlichen p-Werte (Tumor/Normal) der in der Untersuchung verwendeten Primer, die Mittelwerte, Standardabweichung sowie Mediane und Range im Tumorgewebe (TU) und Normalgewebe (NO). Fettgedruckt sind Werte mit statistischer Signifikanz ( $p < 0,05$ ).



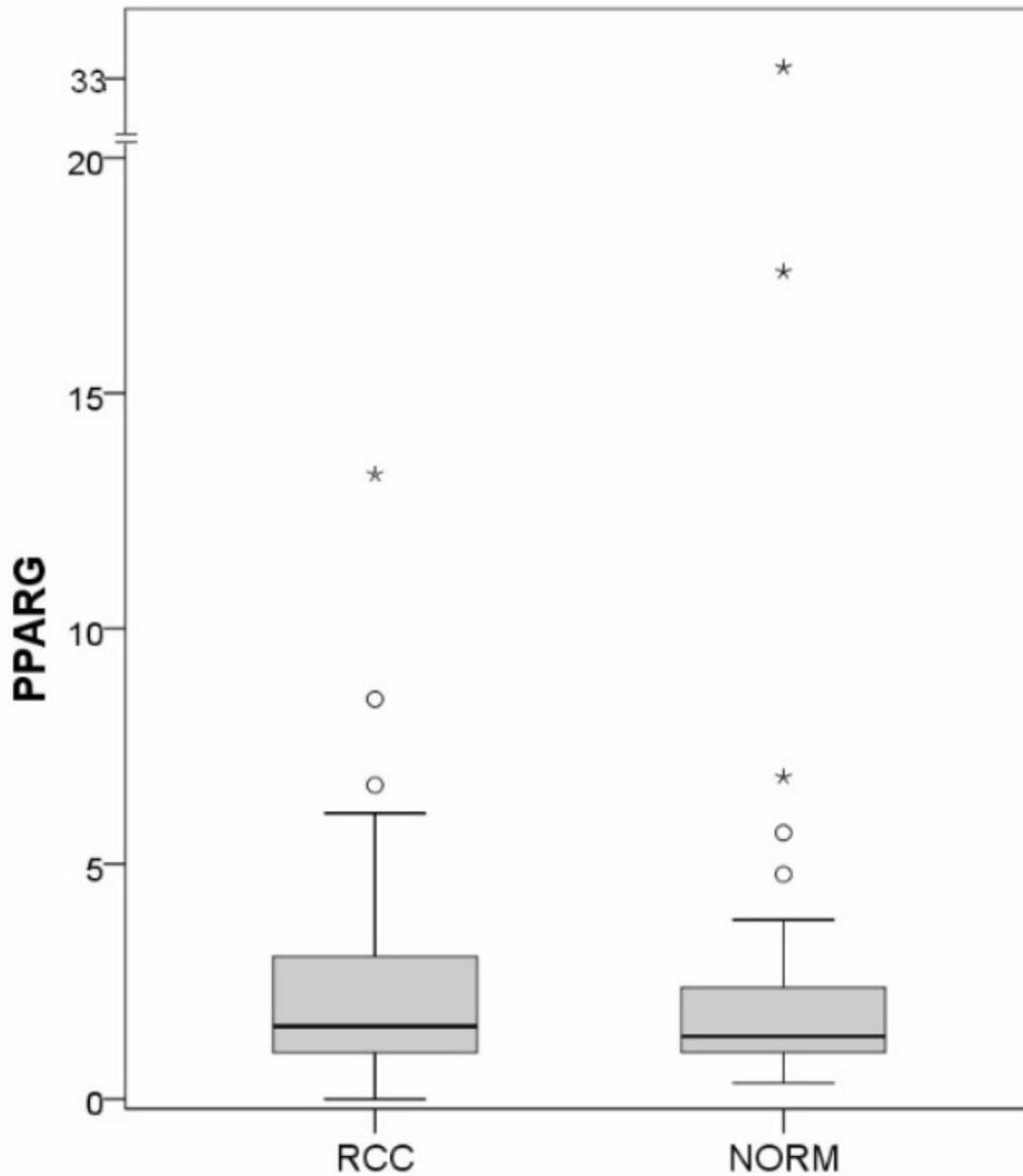
**Abb. 11: Relativiertes RNA Ratio in Tumor- und Normalgewebe**

Abgebildet sind die unterschiedlichen Expressionen in Tumorgewebe (RCC) und Normalgewebe (NORM) des in dieser Studie untersuchten nukleären Rezeptors NR1H3, sowie Ausreißer (°) und Extremwerte (\*).



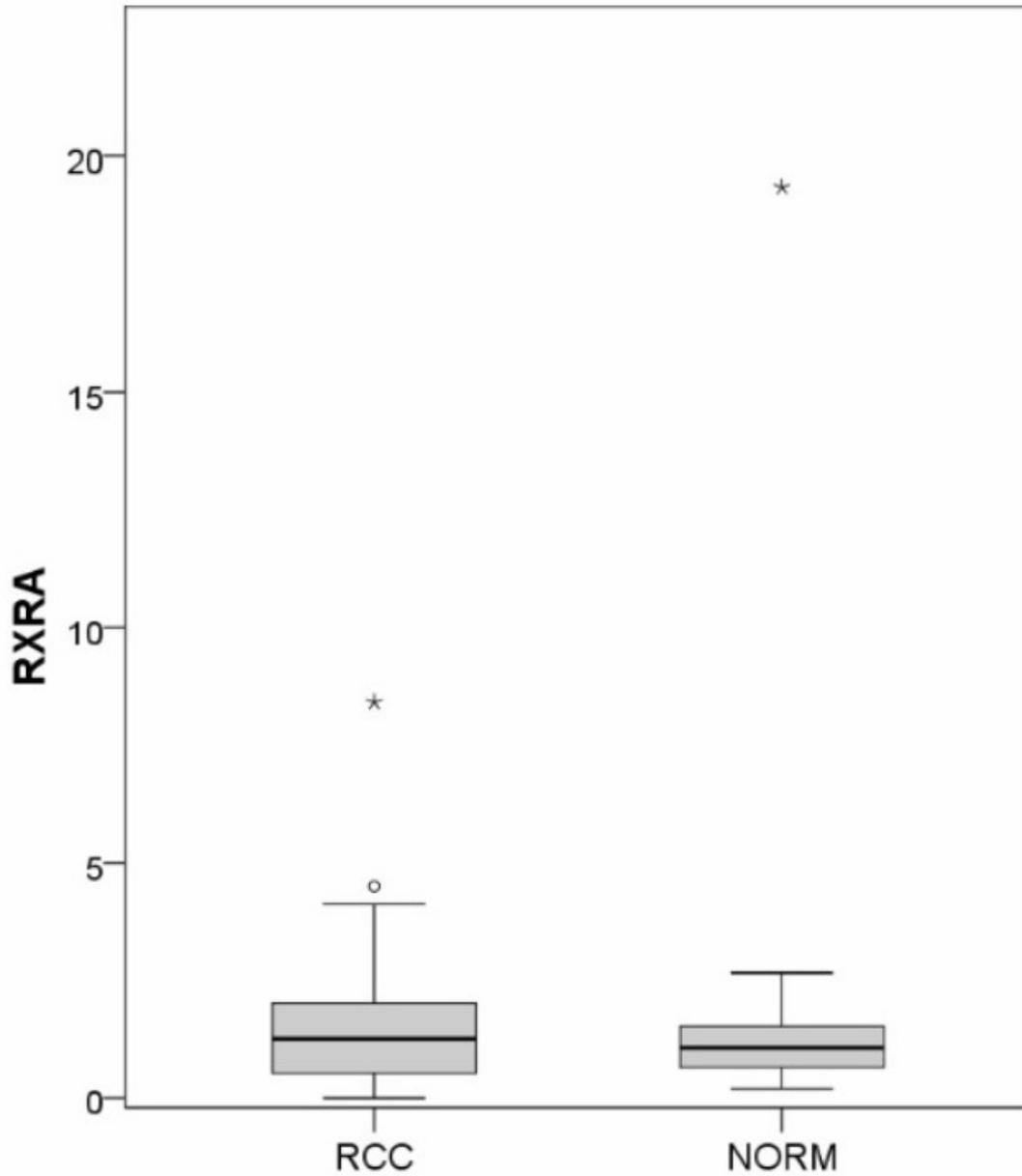
**Abb. 12: Relativiertes RNA Ratio in Tumor- und Normalgewebe II**

Abgebildet sind die unterschiedlichen Expressionen in Tumorgewebe (RCC) und Normalgewebe (NORM) des in dieser Studie untersuchten nukleären Rezeptors NR1H4, sowie Ausreißer (°) und Extremwerte (\*).



**Abb. 13: Relativiertes RNA Ratio in Tumor- und Normalgewebe III**

Abgebildet sind die unterschiedlichen Expressionen in Tumorgewebe (RCC) und Normalgewebe (NORM) des in dieser Studie untersuchten nukleären Rezeptors PPARG, sowie Ausreißer (°) und Extremwerte (\*).



**Abb. 14: Relativiertes RNA Ratio in Tumor- und Normalgewebe IV**

Abgebildet sind die unterschiedlichen Expressionen in Tumorgewebe (RCC) und Normalgewebe (NORM) des in dieser Studie untersuchten nukleären Rezeptors RXRA, sowie Ausreißer (°) und Extremwerte (\*).

## 3.2 Nukleäre Rezeptoren in Korrelation zu den klinisch-pathologischen Parametern

### 3.2.1 Geschlecht

Beim Test auf signifikante Unterschiede der Testparameter zwischen den Geschlechtern wurde der Mann-Whitney-Test angewendet. In den Tumorproben von RXRA bei Männern (n= 29) war signifikant ( $p= 0,038$ ) mehr Produkt aufzufinden als bei Tumorproben von Frauen (n= 17). NR1H3, NR1H4 und PPARG zeigten keine auffälligen Unterschiede. Im Gesundheitsgewebe fanden sich keinerlei signifikant veränderte mRNA Level (siehe Tab. 11).

Tumorproben	NR1H3	NR1H4	PPARG	RXRA
asymptotische Signifikanz	0,585	0,207	0,432	<b>0,038</b>
Gesundgewebe	NR1H3	NR1H4	PPARG	RXRA
asymptotische Signifikanz	0,882	0,223	0,927	0,439

**Tab. 11: Expressionslevel zwischen den Geschlechtern**

Abgebildet sind die Rezeptor-Expressionslevel zwischen den Geschlechtern. In den Tumorproben von RXRA war bei Männern signifikant mehr Produkt aufzufinden als in den Tumorproben von Frauen.

### 3.2.2 Alter

Zur Betrachtung vom Verhältnis des Alters zur Probe wurde der Spearman-Rho-Test angewendet. NR1H4 korrelierte im Gesundheitsgewebe signifikant mit dem Alter ( $p= 0,046$ ). Alle anderen Primer blieben sowohl im Gesund- als auch im Tumorgewebe statistisch unauffällig (siehe Tab. 12).

Tumorproben	NR1H3	NR1H4	PPARG	RXRA
asymptotische Signifikanz	0,35	0,145	0,069	0,383
Gesundgewebe	NR1H3	NR1H4	PPARG	RXRA
asymptotische Signifikanz	0,193	<b>0,046</b>	0,261	0,25

**Tab. 12: Expressionslevel im Verhältnis zum Patientenalter**

Abgebildet sind die Rezeptor-Expressionslevel im Verhältnis zum Patientenalter. Das Expressionslevel von NR1H4 korrelierte im Gesundheitsgewebe signifikant mit dem Alter der Patienten.

### 3.2.3 Pathologische Stadien

Die Betrachtung des TNM- Stadiums erfolgte getrennt für die 5 Kategorien T (Primärtumor), Tumorgröße, M (Metastasierung), V (Veneneinbruch), sowie für das G (Grading). Hierfür wurden der Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney- Test angewendet. Die Untersuchung des Primärtumors mit Hilfe der pT-Stadien zeigte bei PPARG ( $p=0,026$ ) signifikante Ergebnisse. NR1H3, NR1H4 und RXRA blieben in dieser Auswertung ohne signifikantes Ergebnis (siehe Tab. 13).

Tumorproben	NR1H3	NR1H4	PPARG	RXRA
asymptotische Signifikanz	0,942	0,182	<b>0,026</b>	0,538

**Tab. 13: Expressionslevel in pT-Stadien**

Die Tabelle gibt die Rezeptor-Expressionslevel im Bezug auf die pT-Stadien wieder. Für PPARG zeigten sich hierbei signifikante Ergebnisse.

Die Nierenzellkarzinomproben wurden zusätzlich auf mögliche Expressionsunterschiede in den verschiedenen pT- Stadien untersucht. Eingeteilt wurde in eine „Low-Risk-Gruppe“, in der das pT-1 Stadium aufgelistet war und in eine „High-Risk-Gruppe“ mit pT-3 Stadien. Es traten keine signifikanten Unterschiede auf.

### 3.2.4 Tumorgröße

Bei der Auswertung der Ergebnisse bezüglich der Gesamtausdehnung des Tumors war RXRA bei größerer Tumorausdehnung erhöht. Das Signifikanzniveau von  $p=0,049$  war aber grenzwertig. Hier ließ sich ein Konzentrationsunterschied zwischen den Tumorgößen 5,1-7 cm (mittlerer Rang: 11,30) und 7,1-9 cm (mittlerer Rang: 19,30) feststellen (siehe Tab. 14).

Tumorproben	NR1H3	NR1H4	PPARG	RXRA
asymptotische Signifikanz	0,343	0,51	0,896	<b>0,049</b>

**Tab. 14: Expressionslevel im Verhältnis zur Tumorgröße**

Die Tabelle zeigt die Rezeptor-Expressionslevel im Bezug auf die Gesamtausdehnung des Tumors. Signifikante Ergebnisse lieferte RXRA bei größerer Tumorausdehnung.

### 3.2.5 Metastasen

Der Vergleich der Rezeptorexpression zwischen Tumoren, die lokal begrenzt oder metastasiert waren, ergab eine signifikante Erhöhung ( $p=0,024$ ) von RXRA. Der Mittelwert der Expression ergab beim Vorliegen von Metastasen 2,50 bei einem Median von 1,91. In Metastasefreien Gewebeproben lag der Mittelwert bei 1,34 und der Median um 1,14. NR1H3, NR1H4 und PPARG zeigten keine signifikanten Unterschiede (siehe Tab. 15).

Tumorproben	NR1H3	NR1H4	PPARG	RXRA
asymptotische Signifikanz	0,898	0,682	0,898	<b>0,025</b>

**Tab. 15: Expressionslevel beim Vorliegen von Metastasen**

Abgebildet ist der Vergleich der Rezeptor-Expressionslevel zwischen lokal begrenzten und metastasierten Tumoren. Beim Vorliegen von Metastasen war RXRA signifikant erhöht.

Bei der Untersuchung der Proben mit pT-1 Stadium ( $n=21$ ) und pT3- Stadium mit Metastasierung ( $n=24$ ) fanden sich keine signifikanten Unterschiede. Tendenziell zeigten NR1H4 ( $p=0,295$ ), PPARG ( $p=0,517$ ) und RXRA ( $p=0,699$ ) eine erhöhte Konzentration im pT-3 Stadium mit Metastasen, nicht jedoch NR1H3.

### 3.2.6 Grading

Bei der Auswertung von Grading waren keine Unterschiede bzw. Tendenzen feststellbar. Dies lag vor allem an der Häufigkeitsverteilung, wodurch der Test nur begrenzt sinnvoll war (G1:  $n = 6$ , G2:  $n = 39$ , G3:  $n = 1$ ) (siehe Tab. 16).

Tumorproben	NR1H3	NR1H4	PPARG	RXRA
asymptotische Signifikanz	0,226	0,303	0,572	0,157

**Tab. 16: Expressionslevel im Verhältnis zum Grading**

Die Tabelle zeigt die Auswertung der Rezeptor-Expressionslevel im Vergleich zur Tumordifferenzierung. Diese Untersuchung lieferte keine signifikanten Ergebnisse.

### 3.2.7 Veneneinbruch

Auch bei der Untersuchung über den möglichen Veneneinbruch des Tumors konnten keinerlei Aussagen getroffen werden (siehe Tab. 17).

Tumorproben	NR1H3	NR1H4	PPARG	RXRA
asymptotische Signifikanz	0,411	0,982	0,822	0,285

**Tab. 17: Expressionslevel bei Veneneinbruch**

In der Tabelle sind die Rezeptor-Expressionslevel mit dem Veneneinbruch des Tumors korreliert dargestellt. Diese Untersuchung lieferte keine signifikanten Ergebnisse.

### 3.3 Korrelation von mRNA und Protein-Leveln

In vorausgegangenen Arbeiten hatte unsere Arbeitsgruppe Tissue-Micro-Arrays (TMA) aus Nierenkarzinom- und Normalgewebesproben von ca. 80 Patienten hergestellt und mögliche Unterschiede in der Färbeintensität verschiedener nukleärer Rezeptoren untersucht. Unter diesen befanden sich die für meine Studie relevanten NR1H4, PPARG und RXRA. Zur Auswertung wurde die Dignität des Probenmaterials mit dem Remmele-Score bzw. Immunreaktiver Score (IRS) korreliert. Der Remmele-Score bewertet anhand zweier Skalen die Intensität der Färbung und die Anzahl positiv gefärbter Zellen. Man erhält durch Zuordnung der Ergebnisse zwei Werte, deren Produkt den Remmele-Score bildet. Dieser kann Werte zwischen 0 und 12 annehmen. Der Test gilt als positiv sobald Werte >3 erzielt werden (siehe Tab. 18). Es liegt die These zugrunde, dass eine starke Intensität in der immunhistochemischen Färbung des TMA mit einer hohen Expression der jeweiligen Rezeptorart verbunden ist.

pos.Zellkerne in %		Farbreaktion			
		Keine (0)	Schwach (1)	Mäßig (2)	Stark (3)
0%	(0)	0	0	0	0
<10%	(1)	0	1	2	3
10-50%	(2)	0	2	4	6
51-80%	(3)	0	3	6	9
>80%	(4)	0	4	8	12

**Tab. 18: Remmele-Score**

Die Tabelle zeigt die Korrelation zwischen der Färbeintensität und der prozentualen Anzahl der positiv gefärbten Zellen. Bei Punktwerten > 3 gilt der Test als positiv. Eine starke immunhistochemische Färbung des Tissue Micro Array ist mit einer hohen Rezeptorexpression korreliert.

Die aus der Färbung resultierenden Ergebnisse konnte ich in meine Auswertung einbinden und stellte fest, das NR1H4, PPARG und RXR allesamt eine erhöhte Färbeintensität im Tumorgewebe zeigten. PPARG war signifikant im Tumorgewebe erhöht ( $p=0,022$ ). Die Unterschiede für NR1H4 ( $p=0,351$ ) und RXR ( $p=0,614$ ) waren nicht statistisch signifikant, zeigten aber die gleiche Tendenz, wie die Erkenntnisse meiner Studie über die RNA Regulierung. Zusammenfassend kann man zeigen, dass die immunhistochemischen Färbungen die Ergebnisse meiner Untersuchung bestätigen.

## 4. Diskussion

Derzeit erfolgen die Einschätzung der Prognose einer Tumorerkrankung und die entsprechende Therapie meist anhand der Tumordifferenzierung sowie anhand des Tumorstatus. Aktuell steht für das Nierenzellkarzinom kein etablierter Biomarker zur Prädiktion des Krankheitsverlaufs zur Verfügung. Es ist von großer Bedeutung molekulare Biomarker zu etablieren und neue Ansätze für zielgerichtete Therapiestrategien zu entwickeln. Nukleäre Rezeptoren spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation der Transkription im Energiestoffwechsel und damit auch im Tumorgeschehen. Zielsetzung dieser Arbeit war es die Expression von nukleären Rezeptoren zu untersuchen und die zuvor gewonnenen Erkenntnisse auf RNA-Ebene zu validieren. Hierzu wurde die mRNA Expression der nukleären Rezeptoren NR1H3, NR1H4, PPARG und RXRA im Tumor- und Normalgewebe bestimmt. Zur Bestimmung dieser mRNA Expression wurde mittels quantitativer Real-Time PCR die Konzentration der Ziel-Gene in Relation zur Konzentration des Housekeeping-Gens HPRT1 gesetzt. Die Studie wurde hinsichtlich der Vermutung durchgeführt, dass die Expressionlevel der untersuchten nukleären Rezeptoren im Tumorgewebe erhöht sind, wie es bei den zuvor erstellten immunhistochemischen Färbungen der Fall war. Die These, dass die Rezeptordichte aufgrund des gesteigerten Energiestoffwechsels und der schnelleren Proliferationsrate in Tumorzellen erhöht ist, scheint realistisch. In diesem Kontext sind Holbeck et al. zu nennen, die kürzlich erhöhte mRNA Konzentrationen verschiedener nukleärer Rezeptoren in unterschiedlichen Tumoren nachweisen konnten, darunter auch das Nierenkarzinom (Holbeck, S. et al, 2010). Fakt ist, dass eine gesteigerte Lipogenese in Tumorzellen beobachtet werden kann (Swinnen, J. V. et al, 2006). Zudem konnte im Blutserum von Patienten, die an Nierenzellkarzinomen erkrankt waren, erhöhte Konzentrationen von Glukose und Lipiden nachgewiesen werden (Gao, H. et al, 2008). Die gesteigerte Expression von nukleären Rezeptoren, die den Energiestoffwechsel steuern, wäre einem Tumorprozess zuträglich. Bisher sind allerdings wenige Studien zu der Expression von nukleären Rezeptoren in Malignomen der Niere durchgeführt worden. Dagegen finden sich zahlreiche Studien, in denen gesteigerte Vorkommen nukleärer Rezeptoren in anderen Malignomen beschrieben wurden, dazu zählen Tumoren von Prostata, Leber, Lunge und der weiblichen Brust (Brabender, J. et al,

2005;Conde, I. et al, 2008;Kim, H. J. et al, 2007;Schaefer, K. L. et al, 2005). In Zukunft sollen die Rezeptor-Expressionsprofile als Ansatzpunkt für Therapiemaßnahmen von Karzinomen unterschiedlichster Organe dienen (Holbeck, S. et al, 2010). In meiner Studie konnte ich für die mRNA von NR1H3 und NR1H4 eine signifikant höhere Konzentration im Tumorgewebe der Niere nachweisen. PPARG und RXRA zeigten bei diesem Vergleich tendenziell eine erhöhte Konzentration im Tumorgewebe ohne dabei aber signifikante Ergebnisse zu liefern. Die aus den immunhistochemischen TMA-Färbungen gewonnenen Erkenntnisse unserer Arbeitsgruppe wurden mit dieser Studie bestätigt.

## **4.1 Expression nukleärer Rezeptoren**

### **4.1.1 Expression von PPARG**

Der Peroxisom-Proliferator-Aktivierter-Rezeptor- $\gamma$  wurde 1990 entdeckt und spielt eine wichtige Rolle im Energiemetabolismus wie bei der Speicherung und dem Transport von Lipiden. Des Weiteren sind Einflüsse auf die Wundheilung und Entzündungen bekannt (Savage, D. B., 2005). Im Körper findet sich die höchste Konzentration dieses Rezeptors im Fettgewebe, geringere Konzentrationen in Leber und Niere (Belfiore, A. et al, 2009). Kürzlich wurde herausgefunden, dass PPARG-Liganden in verschiedenen Tumoren einen antiproliferativen Effekt besitzen und Apoptose auslösen können (Eibl, G. et al, 2001;Eucker, J. et al, 2006;Inoue, K. et al, 2001;Sugawara, A. et al, 2010). In meiner Untersuchung konnte ich keine signifikanten Expressionsunterschiede von PPARG in Tumor- und Normalgewebe feststellen. Ein Grund hierfür könnte die generell eher geringe Rezeptorexpression im Nierengewebe sein. In bisherigen Studien zum Nierenzellkarzinom konnten zuvor weder auf mRNA Ebene (Yuan, J. et al, 2006), noch anhand von immunhistochemischen Färbungen (Inoue, K. et al, 2001) signifikante Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe festgestellt werden. Dennoch konnte ich in meiner Studie beim Hinblick auf die pT-Stadien im höchsten Stadium (pT3) eine signifikante Erhöhung der PPARG-Expression ( $p=0,026$ ) feststellen.

Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass PPARG beim Nierenkarzinom mit sonst geringer Rezeptordichte nach maligner Entartung und zunehmender Entdifferenzierung vermehrt wird. Die immun-histochemischen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ergaben eine signifikant erhöhte Rezeptor mRNA Expression im Nierenzellkarzinom ( $p=0,022$ ). Der zuvor genannte Aspekt wurde bereits technisch eingesetzt. So konnten Reichle et al. 2007 bereits zeigen, dass der Einsatz von PPARG-Agonisten bei der Behandlung von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom zu einer Besserung der Symptomatik führte. Dies konnte klinisch mit einer Verminderung der Entzündungsreaktion und laborchemisch mit fallenden CRP-Werten korreliert werden, die zuvor stark erhöht waren (Reichle, A. et al, 2007).

In anderen Malignomen wie Pankreas und Brusttumoren wurde nachgewiesen, dass durch PPARG-Rezeptorstimulation Zelldifferenzierungen verändert und Apoptose ausgelöst werden konnten (Mueller, E. et al, 1998; Ohta, T. et al, 2002). Des Weiteren konnten Ma et al. in Magenkarzinomen eine erhöhte Expression von PPARG nachweisen und diese als Therapieansatz nutzen (Ma, X. M. et al, 2009). Denn durch die Aktivierung von PPARG können je nach Ligandenwirkung verschiedenste Reaktionen in der Zelle ausgelöst werden, die man sich im Tumorgeschehen zu Nutze machen kann. Dazu zählen die Möglichkeiten einen Proliferationsstop zu erreichen, in die Zelldifferenzierung und Angiogenese einzugreifen und Entzündungsreaktionen herunterzuregulieren (Panigrahy, D. et al, 2005). Zusammenfassend kann man sagen, dass PPARG Agonisten als mögliche negative Regulatoren für das Tumorwachstum und die Krankheitsprogression auch für das fortgeschrittene Nierenzellkarzinom in Frage kommen. Hierzu sind jedoch noch weitere Forschungen notwendig.

#### 4.1.2 Expression von NR1H3

Der Leber-X-Rezeptor- $\alpha$  reguliert in der Funktion eines Transkriptionsfaktors die Expression von Genen, die in den Lipid- und Glukosestoffwechsel, den reversen Cholesteroltransport und die antiinflammatorischen Prozesse eingebunden sind (Janowski, B. A. et al, 1996;Lehmann, J. M. et al, 1997;Torocsik, D. et al, 2009). Grundsätzlich finden sich hohe Konzentrationen dieses Rezeptors in Zellen von unter anderem Leber, Niere, Fettgewebe sowie in Makrophagen (Phelan, C. A. et al, 2008). In der aktuellen Forschung sind bisher keine Untersuchungen mit NR1H3 und Nierenzellkarzinomen durchgeführt worden, sodass lediglich ein Vergleich mit anderen Malignomen gezogen werden kann. In meiner Studie konnte ich im Tumorgewebe eine signifikant gesteigerte Expression ( $p=0,002$ ) von NR1H3 feststellen. Hauptsächlich gehe ich davon aus, dass der Energiestoffwechsel bei malignen Veränderungen im Vergleich mit Normalgewebe stark gesteigert ist und aus diesem Grund die erhöhte Expression der untersuchten Rezeptoren vorliegt. Zusätzlich könnte der NR1H3 Rezeptor, wie schon in anderen Organen beschrieben, auch im Nierenzellkarzinom in der Funktion als reverser Cholesteroltransporter eine wichtige Rolle spielen. Ich vermute, dass die erhöhte Rezeptorexpression im stoffwechselaktiven Tumorgewebe einen Cholesterolüberschuss vermeiden und dadurch eine längere Überlebenszeit der malignen Zellen ermöglichen kann. Dieser Regulierungsprozess wurde bereits im physiologischen Stoffwechsel von Makrophagen beobachtet. Dort wiesen Whitney et al. erhöhte NR1H3 Konzentrationen nach. Die erhöhte Aktivität des Rezeptors konnte die Zellen vor einem Cholesterolüberschuss schützen, der ansonsten zu einer Schaumzellenumwandlung geführt hätte (Whitney, K. D. et al, 2001). In Studien zu Prostata- und Brustkarzinomen konnten Fukuchi et al zeigen, dass die Aktivierung des Rezeptors NR1H3 durch Liganden, die als Antiandrogene agieren, ein Proliferationsstop ausgelöst werden kann (Fukuchi, J. et al, 2004). Ob diese Therapiemöglichkeiten auch im Fall des Nierenzellkarzinoms funktionieren, sollte in zukünftigen Studien untersucht werden.

### 4.1.3 Expression von NR1H4

Als ein Schlüssel-Regulator der Cholesterolumhomöostase, Triglyzeridsynthese und Lipogenese stellt sich der Farnesoid-X-Rezeptor dar und liegt normalerweise in höherer Konzentration in Leber, Niere und dem Gastrointestinaltrakt vor. Zusätzlich spielt NR1H4 eine essentielle Rolle bei der Glukosehomöostase (Ma, K. et al, 2006). Bislang existieren keine Publikationen zur NR1H4 Expression im Nierenzellkarzinom. In meiner Untersuchung fand ich im Nierentumorgewebe eine signifikant erhöhte Konzentration ( $p < 0,001$ ) von NR1H4. Dieses Ergebnis verstärkt meine schon zu Beginn aufgestellte These einer erhöhten Rezeptorexpression aufgrund des erhöhten Energiebedarfs im Tumorgewebe. Auffällig ist, dass sich bei Betrachtung des Alters im Normalgewebe bei älteren Patienten eine signifikant erhöhte Expression zeigte. Für diese Tatsache konnte ich in der gegenwärtigen Literatur keinen schlüssigen Zusammenhang finden. In den immunhistochemischen Färbungen unserer Arbeitsgruppe wurden erhöhte Färbintensitäten im Tumorgewebe festgestellt ( $p = 0,351$ ). Die Ergebnisse waren nicht signifikant. Doch zeigen sie die gleiche Tendenz zu den von mir auf molekularer Ebene gemachten Beobachtungen. Eine erhöhte Expression dieses Rezeptors in Malignomen wurde zuvor bei Brustkrebs beschrieben (Journe, F. et al, 2009; Swales, K. E. et al, 2006). Dort konnte nach Ligandeninteraktion die Apoptose von Tumorzellen sowie ein Absinken des Aromatasespiegels festgestellt werden. Erhöhte Expressionen konnten des Weiteren mit Prostatakarzinomen in Verbindung gebracht werden (Guillemette, C. et al, 1997). Modica et al. fanden heraus, dass nach einer Aktivierung von NR1H4 in Kolon- und intestinalen Tumorzellen Apoptose auftrat und genetisch veränderte Zellen abgebaut wurden (Modica, S. et al, 2008). Bisher ist NR1H4 im Hinblick auf das Nierenzellkarzinom noch nicht untersucht worden, zeigt aber in anderen Malignomen erfolgsversprechende Ergebnisse und sollte zukünftig in Studien zu Nierenzellkarzinomen berücksichtigt werden.

#### 4.1.4 Expression von RXRA

Der Retinoid-X-Rezeptor tritt sowohl als Homodimer und häufig auch als Bindungspartner für andere nukleäre Rezeptoren (PPARG, LXR, Vitamin D Rezeptoren) auf. RXR Heterodimere erhöhen dabei die DNA-Bindungseffizienz der Partner als ligandenabhängige Transkriptionsregulatoren. RXRA wird grundsätzlich vermehrt im Gewebe von Leber, Niere, Epidermis und inneren Organen gebildet und wirkt schon früh auf die Gewebeentwicklung ein. Des Weiteren nimmt dieser Rezeptor Einfluss auf den Glukose-, Fett- und Cholesterolfstoffwechsel, sowie auf die Differenzierung von Zellen (Ahuja, H. S. et al, 2003; Altucci, L. et al, 2005). In meiner Studie konnte ich keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe feststellen ( $p=0,312$ ). Die Auswertung unserer immun-histochemischen Färbungen zeigte erhöhte Rezeptorlevel im Nierenzellkarzinom. Diese Ergebnisse waren allerdings nicht signifikant ( $p= 0,614$ ), sodass lediglich Tendenzen beschrieben werden können. Gleiches verdeutlichen die Daten von Buentig et al., der zeigte, dass RXRA in Nierenzellkarzinomen sowohl im Zellkern, als auch im Cytosol vorkommt, ohne dabei im Vergleich zum Normalgewebe überexprimiert zu sein. Eine höhere Konzentration im Zellkern war dabei mit einer verbesserten Überlebenswahrscheinlichkeit nach Erstdiagnose verbunden (Buentig, N. et al, 2004). Des Weiteren wurde ein erhöhtes Risiko an Nierenzellkarzinomen zu erkranken in Zusammenhang mit vermehrtem Konsum von Vitamin D und Kalzium gebracht (Karami, S. et al, 2010). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass diätetische Einflüsse generell eine wichtige Rolle im kanzerogenen Prozess spielen. Beispielsweise zeigten Sung et al., dass fettreiche Nahrung die Entstehung von Mamma- und Kolonkarzinomen förderte (Sung, M. K. et al, 2011). Bei immun-histochemischen Untersuchungen von Brustkrebsgeweben beschrieben zuvor Friedrich et al. erhöhte RXRA Expressionen (Friedrich, M. et al, 2002). Im Gegensatz dazu wurden in Studien zu Lungenkarzinomen sowohl erhöhte als auch nicht veränderte Expressionslevel beobachtet (Picard, E. et al, 1999; Xu, X. C. et al, 1997). Höhere Level wurden allerdings in der Studie ermittelt, die mit radioaktiv markierten Proben arbeitete und dadurch als höher sensitiv einzustufen ist, als dies bei nicht radioaktiv markierten Proben der Fall ist. In meiner Studie zeigte sich bei der Betrachtung der Gesamttumorausdehnung, dass RXRA vermehrt in größeren Tumoren

exprimiert war und auch beim Vorliegen von Metastasen signifikant erhöhte Expressionswerte ( $p=0,024$ ) auftraten. Solch erhöhte Rezeptorkonzentrationen fanden sich auch bei Proben von infiltrativ wachsenden Ovarial- und Mammakarzinomen (Kaiser, P. C. et al, 2005). Hierbei scheint die RXRA Überexpression mit einem erhöhten Risiko an invasiven Brustkrebs zu erkranken assoziiert zu sein (Conde, I. et al, 2008; Lawrence, J. A. et al, 1998). Aufgrund dieser Ergebnisse in anderen Organen lässt sich vermuten, dass die Expression von RXRA bei aggressiver Krankheitsprogression auch im Nierenzellkarzinom zunimmt. Zusätzlich konnte ich signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern nachweisen. Die Konzentration der Rezeptor mRNA im Tumorgewebe der Männer war signifikant im Vergleich zu den Proben der Frauen erhöht ( $p=0,038$ ). Für dieses Ergebnis fanden sich in der Literatur allerdings keinerlei Erklärungen. Fakt ist aber, dass Männer statistisch gesehen doppelt so häufig an Nierenzellkarzinomen erkranken als Frauen. Möglicherweise spielt die Expression von RXRA eine Rolle in diesem Prozess. Die Expression von RXRA in anderen Malignomen, sowie die Ergebnisse meiner Studie zeigen, dass die Rolle des Rezeptors RXRA sehr vielfältig ist. Dies liegt meiner Meinung nach daran, dass RXRA in nahezu allen Geweben exprimiert wird und in zahllose Stoffwechselfvorgänge der Zelle involviert ist, wie schon zu Beginn dieses Abschnitts dargelegt. Dennoch ist festzuhalten, dass RXRA Agonisten in Malignomen von zum Beispiel Pankreas (Rosewicz, S. et al, 1996), Mamma (Yen, W. C. et al, 2004) und Lunge (Fu, J. et al, 2007) antitumoröse sowie antiproliferative Effekte auslösten. Diese Erkenntnis könnte somit auch im Hinblick auf Therapiemaßnahmen beim Nierenzellkarzinom von Bedeutung sein.

## 5. Zusammenfassung

Ziel meiner Arbeit war die systematische Untersuchung der Messenger-Ribonukleinsäuren-Expression von nukleären Rezeptoren im Nierenzellkarzinom und Normalgewebe der Niere, um die bisher durch immunhistochemische Färbungen gewonnenen Ergebnisse auf Proteinebene zu bestätigen. Die Rezeptoren könnten einen Ansatzpunkt für Liganden darstellen, die in Zukunft den klinischen Verlauf der Erkrankung positiv beeinflussen und zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien beitragen werden. Hierzu untersuchte ich die Expression der nukleären Rezeptoren PPARG, NR1H3, NR1H4 und RXRA. Diese Expressionsuntersuchungen erfolgten mittels einer quantitativen Real-Time Polymerasekettenreaktion (PCR) bei 46 Patienten, welche sich bei Nierenzellkarzinom einer radikalen Nephrektomie unterzogen hatten. Die Normalgewebeproben stammten aus tumorfreien Bereichen derselben Patienten. Des Weiteren wurden gewonnene Erkenntnisse aus Tissue-Micro-Arrays (TMA) und immunhistochemischen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe in diese Arbeit integriert. Eine höhere Expression der Rezeptoren stellte sich im Tumorgewebe durch eine stärkere Färbeintensität dar, als dies im Normalgewebe der Fall war. Die in meiner Studie untersuchten nukleären Rezeptoren zeigten auf Ebene der Messenger-Ribonukleinsäuren eine höhere Expression im Nierentumorgewebe als im Normalgewebe der Niere. Für NR1H3 und NR1H4 war der Unterschied als signifikant anzusehen. Generell wurde eine positive Korrelationen zwischen starker Färbeintensität und erhöhten globalen Rezeptor Messenger-Ribonukleinsäure-Leveln im Nierentumorgewebe beobachtet. Diese Erkenntnisse ließen sich mit den klinisch-pathologischen Parametern, wie zum Beispiel Tumorstadium, Tumorausdehnung und Metastasierung nur bedingt bestätigen. Zusammenfassend zeigen die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse erhöhte Expressionslevel nukleärer Rezeptor Messenger-Ribonukleinsäuren im Nierenzellkarzinom. Eine weitere Erforschung der Rezeptor-Expressionslevel sowie deren Liganden könnte zukünftig dazu beitragen chemopräventive Strategien zu entwickeln, um die Wirksamkeit der Behandlung vorherzusagen und den klinischen Therapieverlauf abschätzen zu können.

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Polymerasekettenreaktion .....	37
Abb. 2: Schmelzkurvenanalyse .....	38
Abb. 3: Standardgerade .....	39
Abb. 4: Schmelzkurven der PCR-Produkte von NR1H3 und NR1H4 .....	42
Abb. 5: Schmelzkurven der PCR-Produkte von PPARG und RXRA .....	43
Abb. 6: Schmelzkurve HPRT1 .....	44
Abb. 7: Effizienz HPRT1 .....	45
Abb. 8: Effizienzen NR1H3 und NR1H4 .....	46
Abb. 9: Effizienzen PPARG und RXRA .....	47
Abb. 10: Gelelektrophorese .....	48
Abb. 11: Relativiertes RNA Ratio in Tumor- und Normalgewebe I .....	54
Abb. 12: Relativiertes RNA Ratio in Tumor- und Normalgewebe II .....	55
Abb. 13: Relativiertes RNA Ratio in Tumor- und Normalgewebe III .....	56
Abb. 14: Relativiertes RNA Ratio in Tumor- und Normalgewebe IV .....	57

## 7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinom.....	14
Tab. 2: Gradingssystem nach Fuhrmann.....	15
Tab. 3: TNM-Schema der UICC („Interantional Union Against Cancer“).....	16
Tab. 4: Sequenzen und Amplikonlängen der Primer.....	29
Tab. 5: Sequenzen und Basenpaarlänge von HPRT1 .....	30
Tab. 6: Klinisch-pathologische Parameter der Nierenzellkarzinom-Patienten.....	32
Tab. 7: Teilvolumina des 10µl PCR- Reaktionsansatzes .....	40
Tab. 8: Schmelzpunkte der Primer.....	44
Tab. 9: Primereffizienzen .....	45
Tab. 10: P-Werte, Mittelwerte, Standardabweichung, Mediane und Spannweite (Range) des Gesamtkollektivs: .....	53
Tab. 11: Expressionslevel zwischen den Geschlechtern .....	58
Tab. 12: Expressionslevel im Verhältnis zum Patientenalter.....	58
Tab. 13: Expressionslevel in pT-Stadien.....	59
Tab. 14: Expressionslevel im Verhältnis zur Tumorgroße.....	59
Tab. 15: Expressionslevel beim Vorliegen von Metastasen.....	60
Tab. 16: Expressionslevel im Verhältnis zum Grading.....	60
Tab. 17: Expressionslevel bei Veneneinbruch .....	61
Tab. 18: Remmele-Score .....	62

## 8. Literaturverzeichnis

- (1) Ahuja HS, Szanto A, Nagy L, Davies PJ. The retinoid X receptor and its ligands: versatile regulators of metabolic function, cell differentiation and cell death. *J Biol Regul Homeost Agents* 2003; 17(1):29-45.
- (2) Albouy B, Gross GM, Escudier B, Massard C. [Renal cell carcinoma management and therapies in 2010]. *Bull Cancer* 2010; 97:17-28.
- (3) Altucci L, Rossin A, Hirsch O, Nebbioso A, Vitoux D, Wilhelm E et al. Retinoid-triggered differentiation and tumor-selective apoptosis of acute myeloid leukemia by protein kinase A-mediated desubordination of retinoid X receptor. *Cancer Res* 2005; 65(19):8754-8765.
- (4) Ares VY. [Correlation between symptoms and survival in patients with renal cell carcinoma]. *Arch Esp Urol* 2009; 62(3):201-206.
- (5) Ather MH, Masood N, Siddiqui T. Current management of advanced and metastatic renal cell carcinoma. *Urol J* 2010; 7(1):1-9.
- (6) Belfiore A, Genua M, Malaguarnera R. PPAR-gamma Agonists and Their Effects on IGF-I Receptor Signaling: Implications for Cancer. *PPAR Res* 2009; 2009:830501.
- (7) Bono AV, Lovisolo JA. Renal cell carcinoma--diagnosis and treatment: state of the art. *Eur Urol* 1997; 31 Suppl 1:47-55.
- (8) Brabender J, Metzger R, Salonga D, Danenberg KD, Danenberg PV, Holscher AH et al. Comprehensive expression analysis of retinoic acid receptors and retinoid X receptors in non-small cell lung cancer: implications for tumor development and prognosis. *Carcinogenesis* 2005; 26(3):525-530.

- (9) Bretheau D, Lechevallier E, de Fromont M, Sault MC, Rampal M, Coulange C. Prognostic value of nuclear grade of renal cell carcinoma. *Cancer* 1995; 76(12):2543-2549.
- (10) Buentig N, Stoerkel S, Richter E, Dallmann I, Reitz M, Atzpodien J. Predictive impact of retinoid X receptor-alpha-expression in renal-cell carcinoma. *Cancer Biother Radiopharm* 2004; 19(3):331-342.
- (11) Chuu CP. Modulation of liver X receptor signaling as a prevention and therapy for colon cancer. *Med Hypotheses* 2011; 76(5):697-699.
- (12) Conde I, Lobo MV, Zamora J, Perez J, Gonzalez FJ, Alba E et al. Human pregnane X receptor is expressed in breast carcinomas, potential heterodimers formation between hPXR and RXR-alpha. *BMC Cancer* 2008; 8:174.
- (13) De Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T et al. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest* 2005; 85(1):154-159.
- (14) deKernion JB, Mukamel E. Selection of initial therapy for renal cell carcinoma. *Cancer* 1987; 60(3 Suppl):539-546.
- (15) Delahunt B, Bethwaite PB, Nacey JN. Outcome prediction for renal cell carcinoma: evaluation of prognostic factors for tumours divided according to histological subtype. *Pathology* 2007; 39(5):459-465.
- (16) Dello RC, Gavrilyuk V, Weinberg G, Almeida A, Bolanos JP, Palmer J et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma thiazolidinedione agonists increase glucose metabolism in astrocytes. *J Biol Chem* 2003; 278(8):5828-5836.
- (17) Eibl G, Wente MN, Reber HA, Hines OJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces pancreatic cancer cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287(2):522-529.

- (18) Escudier B, Albiges L. Vascular endothelial growth factor-targeted therapy for the treatment of renal cell carcinoma. *Drugs* 2011; 71(9):1179-1191.
- (19) Eucker J, Sterz J, Krebbel H, Zavrski I, Kaiser M, Zang C et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit proliferation and induce apoptosis in mantle cell lymphoma. *Anticancer Drugs* 2006; 17(7):763-769.
- (20) Fischer CG. [Etiology, pathogenesis and therapy of renal cell carcinoma]. *Radiologe* 1999; 39(5):343-349.
- (21) Fokas E, Henzel M, Hamm K, Surber G, Kleinert G, Engenhart-Cabillic R. Radiotherapy for brain metastases from renal cell cancer: should whole-brain radiotherapy be added to stereotactic radiosurgery?: analysis of 88 patients. *Strahlenther Onkol* 2010; 186(4):210-217.
- (22) Friedrich M, Axt-Fliedner R, Villena-Heinsen C, Tilgen W, Schmidt W, Reichrath J. Analysis of vitamin D-receptor (VDR) and retinoid X-receptor alpha in breast cancer. *Histochem J* 2002; 34(1-2):35-40.
- (23) Fu J, Ding Y, Huang D, Li H, Chen X. The retinoid X receptor-selective ligand, LGD1069, inhibits tumor-induced angiogenesis via suppression of VEGF in human non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 2007; 248(1):153-163.
- (24) Fukuchi J, Kokontis JM, Hiipakka RA, Chuu CP, Liao S. Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64(21):7686-7689.
- (25) Gao H, Dong B, Liu X, Xuan H, Huang Y, Lin D. Metabonomic profiling of renal cell carcinoma: high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of human serum with multivariate data analysis. *Anal Chim Acta* 2008; 624(2):269-277.
- (26) Glenn ST, Jones CA, Liang P, Kaushik D, Gross KW, Kim HL. Expression profiling of archival renal tumors by quantitative PCR to validate prognostic markers. *Biotechniques* 2007; 43(5):639-3, 647.

- (27) Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3(11):950-964.
- (28) Guillemette C, Levesque E, Beaulieu M, Turgeon D, Hum DW, Belanger A. Differential regulation of two uridine diphospho-glucuronosyltransferases, UGT2B15 and UGT2B17, in human prostate LNCaP cells. *Endocrinology* 1997; 138(7):2998-3005.
- (29) Holbeck S, Chang J, Best AM, Bookout AL, Mangelsdorf DJ, Martinez ED. Expression profiling of nuclear receptors in the NCI60 cancer cell panel reveals receptor-drug and receptor-gene interactions. *Mol Endocrinol* 2010; 24(6):1287-1296.
- (30) Inoue K, Kawahito Y, Tsubouchi Y, Kohno M, Yoshimura R, Yoshikawa T et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in renal cell carcinoma and growth inhibition by its agonists. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287(3):727-732.
- (31) Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 1996; 383(6602):728-731.
- (32) Jeninga EH, Kalkhoven E. Central players in inherited lipodystrophies. *Trends Endocrinol Metab* 2010.
- (33) Journe F, Durbecq V, Chaboteaux C, Rouas G, Laurent G, Nonclercq D et al. Association between farnesoid X receptor expression and cell proliferation in estrogen receptor-positive luminal-like breast cancer from postmenopausal patients. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 115(3):523-535.
- (34) Kaiser PC, Korner M, Kappeler A, Aebi S. Retinoid receptors in ovarian cancer: expression and prognosis. *Ann Oncol* 2005; 16(9):1477-1487.

- (35) Karami S, Brennan P, Navratilova M, Mates D, Zaridze D, Janout V et al. Vitamin d pathway genes, diet, and risk of renal cell carcinoma. *Int J Endocrinol* 2010; 2010:879362.
- (36) Keller U. From obesity to diabetes. *Int J Vitam Nutr Res* 2006; 76(4):172-177.
- (37) Kim HJ, Hwang JY, Kim HJ, Choi WS, Lee JH, Kim HJ et al. Expression of a peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1 splice variant that was identified in human lung cancers suppresses cell death induced by cisplatin and oxidative stress. *Clin Cancer Res* 2007; 13(9):2577-2583.
- (38) Kim KH, Lee GY, Kim JI, Ham M, Won LJ, Kim JB. Inhibitory effect of LXR activation on cell proliferation and cell cycle progression through lipogenic activity. *J Lipid Res* 2010; 51(12):3425-3433.
- (39) Lam JS, Shvarts O, Leppert JT, Figlin RA, Beldegrun AS. Renal cell carcinoma 2005: new frontiers in staging, prognostication and targeted molecular therapy. *J Urol* 2005; 173(6):1853-1862.
- (40) Lawrence JA, Merino MJ, Simpson JF, Manrow RE, Page DL, Steeg PS. A high-risk lesion for invasive breast cancer, ductal carcinoma in situ, exhibits frequent overexpression of retinoid X receptor. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7(1):29-35.
- (41) Lax S, Schauer G, Prein K, Kapitan M, Silbert D, Berghold A et al. Expression of the nuclear bile acid receptor/farnesoid X receptor is reduced in human colon carcinoma compared to non-neoplastic mucosa independent from site and may be associated with adverse prognosis. *Int J Cancer* 2011.
- (42) Lee JY, Lee KT, Lee JK, Lee KH, Jang KT, Heo JS et al. Farnesoid X receptor, overexpressed in pancreatic cancer with lymph node metastasis promotes cell migration and invasion. *Br J Cancer* 2011; 104(6):1027-1037.

- (43) Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL et al. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* 1997; 272(6):3137-3140.
- (44) Linehan WM, Vasselli J, Srinivasan R, Walther MM, Merino M, Choyke P et al. Genetic basis of cancer of the kidney: disease-specific approaches to therapy. *Clin Cancer Res* 2004; 10(18 Pt 2):6282S-6289S.
- (45) Lipworth L, Tarone RE, McLaughlin JK. The epidemiology of renal cell carcinoma. *J Urol* 2006; 176(6 Pt 1):2353-2358.
- (46) Ma K, Saha PK, Chan L, Moore DD. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest* 2006; 116(4):1102-1109.
- (47) Ma XM, Yu H, Huai N. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is essential in the pathogenesis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2009; 15(31):3874-3883.
- (48) Mehrotra A, Kaul D, Joshi K. LXR-alpha selectively reprogrammes cancer cells to enter into apoptosis. *Mol Cell Biochem* 2011; 349(1-2):41-55.
- (49) Modica S, Murzilli S, Salvatore L, Schmidt DR, Moschetta A. Nuclear bile acid receptor FXR protects against intestinal tumorigenesis. *Cancer Res* 2008; 68(23):9589-9594.
- (50) Mohammad A, McClintock C. Renal cell carcinoma--a great mimicker. *Conn Med* 2007; 71(2):81-84.
- (51) Morrison PJ, Donnelly DE, Atkinson AB, Maxwell AP. Advances in the genetics of familial renal cancer. *Oncologist* 2010; 15(6):532-538.
- (52) Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 1996; 335(12):865-875.
- (53) Motzer RJ, Bukowski RM. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24(35):5601-5608.

- (54) Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, Hudes GR, Wilding G, Figlin RA et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24(1):16-24.
- (55) Moudouni SM, En-Nia I, Patard JJ, Manunta A, Guille F, Lobel B. Real indications for adrenalectomy in renal cell carcinoma. *Scand J Urol Nephrol* 2002; 36(4):273-277.
- (56) Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin KJ, Zhang M et al. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell* 1998; 1(3):465-470.
- (57) Naitoh Y, Kawauchi A, Soh J, Kamoi K, Miki T. Experimental study for electrovaporization of renal cell carcinoma using a new shape memory alloy probe. *Urology* 2010; 75(6):1509-1513.
- (58) Nelson EC, Evans CP, Lara PN, Jr. Renal cell carcinoma: current status and emerging therapies. *Cancer Treat Rev* 2007; 33(3):299-313.
- (59) Nese N, Paner GP, Mallin K, Ritchey J, Stewart A, Amin MB. Renal cell carcinoma: assessment of key pathologic prognostic parameters and patient characteristics in 47,909 cases using the National Cancer Data Base. *Ann Diagn Pathol* 2009; 13(1):1-8.
- (60) Nilsson M, Stulnig TM, Lin CY, Yeo AL, Nowotny P, Liu ET et al. Liver X receptors regulate adrenal steroidogenesis and hypothalamic-pituitary-adrenal feedback. *Mol Endocrinol* 2007; 21(1):126-137.
- (61) Nunez V, Alameda D, Rico D, Mota R, Gonzalo P, Cedenilla M et al. Retinoid X receptor alpha controls innate inflammatory responses through the up-regulation of chemokine expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(23):10626-10631.

- (62) Ohta T, Elnemr A, Yamamoto M, Ninomiya I, Fushida S, Nishimura G et al. Thiazolidinedione, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, modulates the E-cadherin/beta-catenin system in a human pancreatic cancer cell line, BxPC-3. *Int J Oncol* 2002; 21(1):37-42.
- (63) Oliech JS. Clinical presentation and management of renal cell carcinoma. *East Afr Med J* 1998; 75(10):594-597.
- (64) Oya M. [Treatment of renal cell carcinoma with interferons]. *Nippon Rinsho* 2006; 64(7):1281-1285.
- (65) Panigrahy D, Huang S, Kieran MW, Kaipainen A. PPARgamma as a therapeutic target for tumor angiogenesis and metastasis. *Cancer Biol Ther* 2005; 4(7):687-693.
- (66) Petta E, Sotiropoulou-Bonikou G, Kourelis K, Melachrinou M, Bonikos DS. Differential expression and cross-talk of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid-X receptor alpha in urothelial carcinomas of the bladder. *J BUON* 2010; 15(4):740-745.
- (67) Phelan CA, Weaver JM, Steger DJ, Joshi S, Maslany JT, Collins JL et al. Selective partial agonism of liver X receptor alpha is related to differential corepressor recruitment. *Mol Endocrinol* 2008; 22(10):2241-2249.
- (68) Picard E, Seguin C, Monhoven N, Rochette-Egly C, Siat J, Borrelly J et al. Expression of retinoid receptor genes and proteins in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(12):1059-1066.
- (69) Rathmell WK, Godley PA. Recent updates in renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* 2010; 22(3):250-256.
- (70) Reichle A, Grassinger J, Bross K, Wilke J, Suedhoff T, Walter B et al. C-reactive Protein in Patients with Metastatic Clear Cell Renal Carcinoma: An Important Biomarker for Tumor-associated Inflammation. *Biomark Insights* 2007; 1:87-98.

- (71) Rosewicz S, Brembeck F, Kaiser A, Marschall ZV, Riecken EO. Differential growth regulation by all-trans retinoic acid is determined by protein kinase C alpha in human pancreatic carcinoma cells. *Endocrinology* 1996; 137(8):3340-3347.
- (72) Savage DB. PPAR gamma as a metabolic regulator: insights from genomics and pharmacology. *Expert Rev Mol Med* 2005; 7(1):1-16.
- (73) Savaj S, Liakopoulos V, Ghareeb S, Musso C, Sahu K, Bargman JM et al. Renal cell carcinoma in peritoneal dialysis patients. *Int Urol Nephrol* 2003; 35(2):263-265.
- (74) Schaefer KL, Wada K, Takahashi H, Matsushashi N, Ohnishi S, Wolfe MM et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibition prevents adhesion to the extracellular matrix and induces anoikis in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 2005; 65(6):2251-2259.
- (75) Schulman IG. Nuclear Receptors as Drug Targets for Metabolic Disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2010.
- (76) Shimizu M, Moriwaki H. Synergistic Effects of PPARgamma Ligands and Retinoids in Cancer Treatment. *PPAR Res* 2008; 2008:181047.
- (77) Speca J, Yenser S, Creel P, George D. Improving outcomes with novel therapies for patients with newly diagnosed renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 2006; 5 Suppl 1:S24-S30.
- (78) Sugawara A, Uruno A, Kudo M, Matsuda K, Yang CW, Ito S. Effects of PPARgamma on hypertension, atherosclerosis, and chronic kidney disease. *Endocr J* 2010.
- (79) Sung MK, Yeon JY, Park SY, Park JH, Choi MS. Obesity-induced metabolic stresses in breast and colon cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1229(1):61-68.

- (80) Swales KE, Korbonits M, Carpenter R, Walsh DT, Warner TD, Bishop-Bailey D. The farnesoid X receptor is expressed in breast cancer and regulates apoptosis and aromatase expression. *Cancer Res* 2006; 66(20):10120-10126.
- (81) Swinnen JV, Brusselmans K, Verhoeven G. Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; 9(4):358-365.
- (82) Thyavihally YB, Mahantshetty U, Chamarajanagar RS, Raibhattanavar SG, Tongaonkar HB. Management of renal cell carcinoma with solitary metastasis. *World J Surg Oncol* 2005; 3:48.
- (83) Torocsik D, Szanto A, Nagy L. Oxysterol signaling links cholesterol metabolism and inflammation via the liver X receptor in macrophages. *Mol Aspects Med* 2009; 30(3):134-152.
- (84) Van Poppel H. Efficacy and safety of nephron-sparing surgery. *Int J Urol* 2010; 17(4):314-326.
- (85) Villablanca EJ, Raccosta L, Zhou D, Fontana R, Maggioni D, Negro A et al. Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nat Med* 2010; 16(1):98-105.
- (86) Whitney KD, Watson MA, Goodwin B, Galardi CM, Maglich JM, Wilson JG et al. Liver X receptor (LXR) regulation of the LXRA gene in human macrophages. *J Biol Chem* 2001; 276(47):43509-43515.
- (87) Xu XC, Sozzi G, Lee JS, Lee JJ, Pastorino U, Pilotti S et al. Suppression of retinoic acid receptor beta in non-small-cell lung cancer in vivo: implications for lung cancer development. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(9):624-629.
- (88) Yamazaki K, Shimizu M, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R, Kanemura N, Araki H et al. Synergistic effects of RXR alpha and PPAR gamma ligands to

inhibit growth in human colon cancer cells--phosphorylated RXR alpha is a critical target for colon cancer management. *Gut* 2007; 56(11):1557-1563.

- (89) Yang F, Huang X, Yi T, Yen Y, Moore DD, Huang W. Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor farnesoid X receptor. *Cancer Res* 2007; 67(3):863-867.
- (90) Yang FG, Zhang ZW, Xin DQ, Shi CJ, Wu JP, Guo YL et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands induce cell cycle arrest and apoptosis in human renal carcinoma cell lines. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26(6):753-761.
- (91) Yen WC, Prudente RY, Lamph WW. Synergistic effect of a retinoid X receptor-selective ligand bexarotene (LGD1069, Targretin) and paclitaxel (Taxol) in mammary carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 88(2):141-148.
- (92) Yoshimura R, Matsuyama M, Hase T, Tsuchida K, Kuratsukuri K, Kawahito Y et al. The effect of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand on urological cancer cells. *Int J Mol Med* 2003; 12(6):861-865.
- (93) Yuan J, Takahashi A, Masumori N, Itoh N, Tsukamoto T. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is frequently underexpressed in renal cell carcinoma. *Int J Urol* 2006; 13(3):265-270.
- (94) Zhao C, Dahlman-Wright K. Liver X receptor in cholesterol metabolism. *J Endocrinol* 2010; 204(3):233-240.

## 9. Danksagung

Für die Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei:

- Professor Dr. med. Dr. h.c. Stefan C. Müller für die Überlassung des Themas und dafür, dass er mir die Arbeit im Labor seiner Klinik ermöglicht hat
- Dr. med. Sebastian Rogenhofer und Dr. med. Jörg Ellinger für die hervorragende Betreuung, den großen Zeiteinsatz und die Hilfestellungen
- Cora Thiel für die aufmunternden Zusprüche bei Motivationstiefen
- meiner Familie und meinen Freunden für die moralische Unterstützung
- Doris Schmidt für die grenzenlose Geduld, die intensive Einweisung in die wissenschaftlichen und experimentellen Handlungsabläufe und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr bei Problemen hatte