Aus der I. Medizinischen Klinik Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Direktor Prof. Dr. A. W. Lohse

# Proliferative Wirkung von Gastrin

# an der Niere

# am Beispiel der MDCK-Zelllinie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

## Hanna Michaelis

aus Hamburg

Hamburg 2006

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 10. April 2007

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Bläker

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. de Weerth

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. Laack

# Inhaltsverzeichnis

1.	Arbeitshypothese und Fragestellung	4
2.	Einleitung	6
	2.1 Das Peptidhormon Gastrin	6
	2.2 Der CCK <sub>2</sub> -Rezeptor	7
	2.3 Die MDCK-Zelllinie	9
	2.4 Signaltransduktion	9
	2.5 Zielsetzung	12
3.	Material und Methoden	13
	3.1 Material	13
	3.1.1 Medien	13
	3.1.2 Lösungen	13
	3.1.3 Puffer	14
	3.1.4 Zellen	15
	3.1.5 SDS-Polyacrylamidgele	15
	3.1.6 Hormone	15
	3.1.7 Antikörper	15
	3.1.8 Substanzen	16
	3.1.9 Geräte	16
	3.2 Methoden	17
	3.2.1 Zellkultur	17
	3.2.2 PCR	17
	3.2.3 Immunzytochemie	19
	3.2.4 Zählversuche	20
	3.2.5 BrdU-Proliferationsassay	21
	3.2.6 Western Blot	23
4.	Ergebnisse	25
	4.1 Nachweis des CCK2-Rezeptors in MDCK-Zellen und	25
	humanem Nierenzell-Ca	
	4.1.1 PCR	25
	4.1.2 Immunzytochemie	26
	4.2 Proliferation der MDCK-Zellen durch Gastrin	27
	4.2.1 Zählversuche	27
	4.2.2 BrdU-Proliferationsassays	29
	4.3 Vermittlung der Gastrinwirkung über MAPK-Kaskade	31
	4.3.1 Raf-Phosphorylierung	31

	4.3.2 MEK-Phosphorylierung	33
	4.3.3 MAPK-Phosphorylierung	35
5.	Diskussion	38
	5.1 CCK <sub>2</sub> -Rezeptor-Expression	38
	5.2 Gastrin als Wachstumsfaktor	39
	5.3 Signaltransduktion	41
	5.4 Gastrin an der Niere	44
	5.4.1 Proliferation	44
	5.4.2 Elektrolythaushalt	44
	5.4.3 Niereninsuffizienz	45
	5.5 Ausblick	46
6.	Zusammenfassung	47
7.	Literaturverzeichnis	52
8.	Danksagung	53
9.	Lebenslauf	54
10.	Erklärung	55

## 1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Cholezystokinin<sub>2</sub>-Rezeptoren (CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren) werden in zahlreichen Geweben des Gastrointestinaltraktes, im Gehirn und in menschlichen Tumoren gefunden. Seit Mitte der neunziger Jahre ist bekannt, dass sie zudem in der menschlichen Niere in hoher Dichte exprimiert werden. Über das Vorkommen des CCK<sub>2</sub>-Rezeptors in humanen Nierenzell-Karzinomen gibt es bislang keine Angaben in der Literatur. CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren können in normalen und in tumorös entarteten Geweben Zellwachstum vermitteln. Am besten bekannt sind hierbei die CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-tragenden ECL (enterochromaffine-like)-Zellen des Magens, die bei Zuständen von Hypergastrinämie proliferieren und u.U. in ECL-Karzinoide entarten können.

Die Funktion der CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren in der Niere ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Bisherige Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass sie auch dort Wachstum anregen.

In dieser Arbeit werden MDCK-Zellen, eine heterologe Sammelrohrepithel-Zelllinie vom Hund, untersucht, um den wachstumsvermittelnden Effekt von CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren an Nierenzellen weiter zu charakterisieren. Vor dem Hintergrund, dass sich bei feingeweblichen Untersuchungen der Meerschweinchenniere die Sammelrohre und Tubuli durch eine hohe CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-Expression ausgewiesen hatten (de Weerth et al., 1998), wurde hier angenommen, dass MDCK-Zellen ebenfalls CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-positiv sind.

Da bisherige Untersuchungen an MCT-Zellen (renale murine Tubuluszellen) zeigten, dass diese gastrinsensibel waren und proliferierten (de Weerth et al., 1998), wurde die Hypothese aufgestellt, dass Gastrin auch in MDCK-Zellen eine Rolle als Wachstumsfaktor spielt.

Als erstes sollte in dieser Arbeit die CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-Präsenz in den MDCK-Zellen überprüft werden. Parallel dazu untersucht werden, ob CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren in humanen Nierenzellkarzinomen exprimiert werden.

Anschließend sollte untersucht werden, ob die MDCK-Zellen durch Gastrin proliferieren.

Mitogene Signale werden in der Mehrzahl der Zellen über eine Involvierung von MAP (mitogen activated protein)-Kinasen, weitergeleitet. Bei Zellen, die durch Gastrin wachsen, sind aber auch MAPK-unabhängige Signaltransduktionswege beschrieben worden. Daher sollte geklärt werden, ob einem Gastrin-induzierten Wachstum von MDCK-Zellen eine Aktivierung der MAPK-Kaskade mit Phosphorylierung der Signalproteine Raf, MEK und ERK zu Grunde liegt.

## 2. Einleitung

## 2.1 Das Peptidhormon Gastrin

Gastrin und Cholezystokinin (CCK) gehören zu einer Familie gastrointestinaler Hormone, die sehr unterschiedliche Funktionen im Gastrointestinaltrakt und im zentralen Nervensystem regulieren (1). Beide Peptidhormone weisen eine identische COOH-terminale Pentapeptidstruktur auf. CCK entsteht aus einer 115 Aminosäuren langen Vorstufe und kommt beim Menschen prozessiert vor allem in 8- und 58-Aminosäureformen vor (2). Es wird in intestinalen neuroendokrinen Zellen und Neuronen gebildet. Gastrin entsteht aus dem 101 Aminosäuren langen Prepro-Gastrin und kommt prozessiert in Form eines 17 und eines 34 Aminosäuren langen Peptids vor (1). Gastrin-34 wird vor allem im Hypophysenvorderlappen, Gastrin-17 zu neunzig Prozent in den G-Zellen des Magenantrums gebildet (3). Für CCK und Gastrin gilt, dass sie ihre volle biologische Aktivität durch die  $\alpha$ -Amidierung des C-terminalen Endes entfalten (4). Die Sekretion von Gastrin-17 in die Zirkulation wird stimuliert durch in der Nahrung enthaltene Aminosäuren, Peptide und Kalzium sowie durch das Gastrin-releasing peptide (GRP) (5).

Die wichtigsten Funktionen von Gastrin im Magen-Darm-Trakt sind die Stimulierung der Magensäuresekretion und die Kontraktion von glatten Muskelzellen im Magen (6-8). Die Stimulierung der Magensäurebildung geschieht auf zwei Wegen: direkt über eine Aktivierung von H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasen in Parietalzellen (9) und indirekt, indem Gastrin eine Freisetzung von Histamin aus ECL (enterochromaffine-like)-Zellen bewirkt. Histamin gelangt über parakrine Diffusion zu den Parietalzellen und induziert dort die Magensäurebildung (10) (*Abbildung 2.1*).

Hypergastrinämische Zustände wie beim Zollinger-Ellison-Syndrom können daher Ursache von peptischen Ulcera sein. Weiterhin besitzt Gastrin trophische Effekte auf die Magenmukosa, zum Beispiel auf ECL-Zellen (10-12). Eine chronische Hypergastrinämie erhöht das Risiko von ECL-Zell-Hyperplasien und endokrinen

Magentumoren (Karzinoiden) (11, 13). Auch auf Karzinome des Magens und Dickdarms besitzt Gastrin eine proliferative Wirkung (1, 10, 14-17).



Abb. 2.1: Magensäurebildung durch Gastrin

## 2.2 Der CCK<sub>2</sub>-Rezeptor

Gastrin vermittelt seine Wirkungen wie sein verwandtes Peptidhormon Cholezystokinin über einen Cholezystokinin-Rezeptor. CCK-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und bestehen aus sieben transmembranären Domänen, die in der Plasmamembran verankert sind (18, 19). Nach Bindung von Hormonen an diese Rezeptoren kommt es über die Kopplung an heterotrimere G-Proteine zur Aktivierung von Phospholipase C. Dieses Enzym bewirkt eine intrazelluläre Freisetzung der "second messenger" Diacylglycerin (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>). Durch DAG werden weitere Proteinkinasen aktiviert, die andere Enzyme, Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren phosphorylieren können. IP<sub>3</sub> führt zu einer Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration und setzt dadurch ebenfalls weitere zelluläre Prozesse, wie z.B. die Aktivierung von Proteinkinasen, in Gang (*Abbildung 2.2*).

Es sind bis heute zwei CCK-Rezeptor Subtypen differenziert worden: der CCK<sub>1</sub>-Rezeptor (auch Typ-A (Azinus) Rezeptor) und der CCK<sub>2</sub>-Rezeptor (auch Typ-B (Brain)

Rezeptor), wobei die Affinität von Gastrin ebenso wie die des spezifischen Antagonisten L-365,260 zum CCK<sub>2</sub>-Rezeptor wesentlich größer ist (9, 18, 19-21).

CCK<sub>1</sub>- und CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren sind in verschiedenen Organen des menschlichen Gastrointestinaltraktes (z.B. Magenkorpus, Gallenblase, Pankreas) gefunden und ihre Vermittlung von wichtigen Funktionen bei der endokrinen Regulierung der Verdauung ausführlich beschrieben worden (1, 22-28). CCK<sub>1</sub>- und CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren wurden auch im Gehirn nachgewiesen und sind dort möglicherweise unter anderem an dopaminergen Wirkungen beteiligt (22, 29).

Weiterhin wurden CCK<sub>1</sub>- und CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren in gastrointestinalen und extraintestinalen Malignomen gefunden. Reubi et al. konnten 1997 mittels Rezeptor-Autoradiographie die Präsenz von CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren in verschiedenen menschlichen Tumoren nachweisen, unter anderem im Medullären Schilddrüsenkarzinom, Kleinzelligen Bronchialkarzinom, Astrozytom, Ovarialkarzinom, Kolorektalem Karzinom und in Lymphomen. In humanen Nierenzell-Karzinomen waren sie nicht nachweisbar (10, 31). Proliferative Effekte über den CCK<sub>2</sub>-Rezeptor sind unter anderem im menschlichen Magenkarzinom, Kolonkarzinom, Leyomyosarkom, Neuroblastom und Kleinzelligen Bronchialkarzinom nachgewiesen worden (1, 9, 10, 14-17, 30, 32).

Die Expression von CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren in der menschlichen Niere wurde von Wank 1995 im Rahmen der Klonierung der humanen CCK<sub>1</sub>- und CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren entdeckt (9). 1998 wiesen de Weerth et al. CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-Transkripte in der Niere des Meerschweinchens nach und zeigten anhand von immunhistologischen Untersuchungen, dass der Rezeptor an Sammelrohren, Tubuli, Glomeruli und Mesangiumzellen exprimiert wird (33, 34). Die bisherigen Daten weisen darauf hin, dass der CCK<sub>2</sub>-Rezeptor an der Niere Wachstum vermittelt. Zuverlässige Daten liegen für proximale Tubuluszellen (MCT) (33), eine humane Nephroblastomzelllinie (G401) (14) und humane embryonale Nierenzellen (HEK 293) (35) vor. Daneben konnte

nachgewiesen werden, dass Gastrin bei Tubulus- und Sammelrohrzellen der Ratte signifikante Veränderungen der Natrium- und Kaliumresorption bewirkt, vermittelt über den CCK<sub>2</sub>-Rezeptor (36).

#### 2.3 Die MDCK-Zelllinie

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich ebenfalls mit einer renalen Zelllinie, der Madin darby canine kidney (MDCK)-Zelllinie, in der die Funktion des CCK<sub>2</sub>-Rezeptors hinsichtlich Proliferation untersucht werden soll.

Bei den MDCK-Zellen handelt es sich um heterogene Sammelrohrepithelzellen vom Hund. Gekle et al. klonten 1994 zwei Subtypen der MDCK-Zelllinie und stellten fest, dass diese trotz gleicher Kulturbedingungen beständig verschiedene morphologische und funktionelle Eigenschaften zeigten. Sie nannten sie C7- und C11-Zellen (37).

Auch das renale Sammelrohr besteht aus zwei Zelltypen: Hauptzellen, die Kalium sezernieren und Natrium resorbieren, und Zwischenzellen, die für den transepithelialen Säure-Base-Transport zuständig sind (38-39). Die Zwischenzellen lassen sich weiter in A-Zwischenzellen und B-Zwischenzellen unterteilen, die sich in der apikalen beziehungsweise basolateralen Lokalisation ihrer membranständigen H<sup>+</sup>-ATPasen und CI/HCO<sub>3</sub>-Austauscher unterscheiden (40-41). Aufgrund ihrer umfangreichen Untersuchungen, transepithelialen insbesondere über den lonentransport. charakterisierten Gekle et al. MDCK C7 als Modell für Hauptzellen und C11 für Zwischenzellen des Sammelrohres (37).

## 2.4 Signaltransduktion

Ein wichtiger Teil dieser Arbeit ist die Untersuchung der intrazellulären Mechanismen, die in MDCK-Zellen mitogene Signale von der Zelloberfläche bis zum Kern leiten. Nach der Bindung von Gastrin an den CCK<sub>2</sub>-Rezeptor und der Aktivierung des Rezeptor-gekoppelten G-Proteins verlaufen die Signalwege je nach Zelltyp in unterschiedliche Richtungen: bei AR4-2J-Zellen (Pankreas-Adenokarzinom, Ratte), die

nach Gastrinstimulation wachsen, kommt es zu einer Phosphorylierung von Shc und Aktivierung der MAPK-Kaskade (31, 42-44) und zur Induktion des "early response"-Gens *c-fos* (45). In GH<sub>3</sub>-Zellen (Hypophyse, Ratte) bewirkt Gastrin eine identische Proliferationsantwort, jedoch ohne MAPK- oder *c-fos*- Aktivierung. Hier sind noch nicht bekannte Signalwege verantwortlich, die durch eine Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aktiviert werden (46).

Die MAPK-Kaskade ist bei wachsenden Zellen sehr gut charakterisiert und vielfach untersucht worden (11, 31, 42, 45-47) MAPKs, auch ERKs (extracellular regulated protein kinases) genannt, werden von weiteren Proteinkinasen (MAPKK= MEK, MAPKKK= Raf) durch Phosphorylierung aktiviert, und zwar in der Reihenfolge: p-Raf – p-MEK – p-ERK (48, 49) (*Abbildung 2.2*). Die ERKs stimulieren andere zelluläre Enzyme sowie nukleäre Transkriptionsfaktoren wie Elk-1 und Sap-1a. Diese wiederum regulieren die Aktivität des Promotors für das Protoonkogen *c-fos* (50).

Die MAPK-Kaskade kann über verschiedene Wege in Zellen aktiviert werden, z.B. über eine Ca<sup>2+</sup>-vermittelte Phosphorylierung der Signalproteine Src und Shc, oder direkt durch die Proteinkinase C (PKC) (10) (*(Abbildung 2.2)*.

In dieser Arbeit soll geprüft werden, ob eine vermehrte Phosphorylierung von MAPKs für die Proliferation der MDCK-Zellen verantwortlich ist. Dafür wurden die Zellen mit Gastrin stimuliert. In Western Blots erfolgte die Detektion der phosphorylierten Proteine der MAPK-Kaskade mittels spezifischer Antikörper.



Abb. 2.2: Die Aktivierung des CCK<sub>2</sub>-Rezeptors führt nach Spaltung von PIP<sub>2</sub> in DAG und IP<sub>3</sub> zur Phosphorylierung der MAPK-Signalproteine auf zwei Wegen: 1. DAG-vermittelte Aktivierung der PKC. 2. IP<sub>3</sub>-vermittelte Kalziumfreisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum und Aktivierung von zytosolischen Adapterproteinen wie Src und Shc. *Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis.* 

## 2.5 Zielsetzung

Diese Arbeit untersucht die Funktion des CCK<sub>2</sub>-Rezeptors hinsichtlich Proliferation in MDCK-Zellen, einer renalen Sammelrohrepithel-Zelllinie vom Hund.

CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren werden in der humanen Niere exprimiert (9), im Tiermodell ist ihre prädominante Lokalisation an Tubuli und Sammelrohren festgestellt worden (33, 34). Die Funktion der CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren in der Niere ist noch nicht genau bekannt, jedoch liegen Hinweise auf einen Gastrin-induzierten Wachstumseffekt vor (14, 33, 35).

Da der Nachweis erbracht worden war, dass CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren auf renalen Sammelrohrzellen exprimiert werden (33, 34), wurde hier angenommen, dass MDCK-Zellen ebenfalls CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-positiv sind.

Vor dem Hintergrund, dass MCT-Zellen (renale murine Tubuluszellen) durch Gastrin stimuliert werden konnten und dadurch proliferierten, wurde die Hypothese aufgestellt, dass Gastrin auch in MDCK-Zellen eine Rolle als Wachstumsfaktor spielt.

Zunächst sollte die CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-Präsenz in den MDCK-Zellen überprüft werden. Gleichzeitig sollte das Vorkommen von CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren in humanen Nierenzellkarzinomen untersucht werden. Anschließend sollte untersucht werden, ob Gastrin in MDCK-Zellen Wachstum induziert und über welche Signaltransduktionswege dieses vermittelt wird.

# 3. Material und Methoden

# 3.1 Material

## 3.1.1 Medien

MEM with Earle's salts M0	MEM with Earle's salts+ 1% Penicillin/	Gibco
	Streptomycin	
MEM with Earle's salts M1	MEM with Earle's salts+ 5% Fetales	Gibco
	Rinderserum (FCS)+ 1%	
	Penicillin/Streptomycin	
MEM with Earle's salts M2	MEM with Earle's salts+ 10% FCS+ 1%	Gibco
	Penicillin/Streptomycin	

# 3.1.2 Lösungen

ECL-Lösung (Enhanced	20% ECL-1, 20% ECL-2, Aqua dest	Amersham
ChemiLuminescence)		
25% Trypanblau	25% Trypanblau in	Merck
	0,9% NaCl	Sigma
5% Magermilch in TBS/T	5% Magermilch in	Nestle
	TBS/Tween	s.u.
1% BSA/ PBS	1% BSA (bovine serum albumin) in	Pierce
	PBS (phosphate buffered saline)	Gibco
BCA-Reaktionsgemisch	Reagenz A (Bicinchoninic acid)+ Reagenz	Pierce
	B (4% Kupfersulfatlösung) (51:1)	
DAB Plus-Substratlösung	Substratpuffer+ 2% DAB Chromogen	Dako
		Corporation
Gastrin-Stammlösung	10 <sup>-3</sup> M Gastrin in	Bachem
	25% NH₄OH	Bio-Rad
EGF-Stammlösung	10 <sup>-4</sup> M EGF in Aqua dest	Bachem
L-365,260-Stammlösung	10 <sup>-4</sup> L365,260 in	Merck
	40% DMSO	Sigma
PCR-Reaktionsansatz	10x PCR-Puffer, 10mM dNTP- Mix, Taq-	Invitrogen
	Polymerase, H <sub>2</sub> O	
Reverse Transkription-	10x First strand buffer, 50mM MgCl <sub>2</sub> ,	Invitrogen
Reaktionsansatz	10mM dNTP-Mix, DTT (Dithiothreitol)	

# 3.1.3 Puffer

Lysis-Puffer (pH 7,5-7,6)	50mM Hepes pH 7,6	Sigma
	4mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma
	150mM NaCl	Sigma
	1% Triton X 100	Merck
	2mM PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Sigma
	2µg/ ml Aprotinin	Sigma
	5µg/ ml Leupeptin	Sigma
	2mM Natriumvanadat	Sigma
	100mM Natriumflourid	Sigma
	50mM Natriumpyrophosphat	Sigma
Laufpuffer (pH 8,3)	25mM Tris-Base	Invitrogen
	192mM Glycin	Carl Roth
		GmbH& Co
	0,1% SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Bio Rad
TBS/Tween	1x Tris-Base	Invitrogen
	0,1% Tween-20	Merck
Lämmli-Puffer	0,01% Bromphenolblau	Merck
	10mM Natriumhydrogenphosphat/	Merck
	Natriumdihydrogenphosphat, pH=7,	
	10% Glycerol	Sigma
	2% SDS	Bio Rad
Sammelgelpuffer	0,5M Tris-Base pH= 6,8	Invitrogen
Trenngelpuffer	1,5M Tris-Base, pH= 8,8	Invitrogen
Semy-Dry-Blotpuffer (pH=9,2)	48mM Tris-Base	Invitrogen
	1,3mM SDS	Bio Rad
	20% Methanol	Merck
	21mM Glycin	Carl Roth
		GmbH& Co
Blockpuffer (pH=7,4)	25 mM Tris	Invitrogen
	137mM NaCl	Sigma
	5% Magermilch in 0,1% TBS/Tween	S.O.
EDTA-Puffer	O,2g EDTA, 8,0g NaCl, 0,2g KCl, 1,15g	Sigma
	Na2HPO4, 0,2g KH2PO4, ad 1000ml Aqua	
	dest	

## 3.1.4 Zellen

MDCK-Zellen Physiologisches Institut der Universität Würzburg (30)

# 3.1.5 SDS-Polyacrylamid-Gele

4% Sammelgel (2 Gele)	0,5ml 40% Acrylamid/BIS, 1,25ml	Bio Rad
	Sammelgelpuffer, 3,2ml Aqua dest, 50µl	
	10% SDS, 50µl 10%, Ammoniumpersulfat,	
	10µl Temed (N,N,N,N'-Tetra-methyl-	
	ethylenediamine)	
10% Trenngel (für 2 Gele)	3,75ml 40% Acrylamid/BIS, 3,75ml	Bio Rad
	Trenngelpuffer, 7,19ml Aqua dest, 150µl	
	10% SDS, 150µl 10% Ammoniumpersulfat,	
	7,5µl Temed	

# 3.1.6 Hormone

Gastrin 17-I (human)	Pyr-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-	
	Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	
EGF (Epidermal Growth		Bachem
Factor) (mouse)		
L-365,260	CCK <sub>2</sub> -Rezeptor-Antagonist	Merck

# 3.1.7 Antikörper

Anti-Huhn Immunglobulin Y vom Kaninchen, Peroxidase-konjugiert	Dianova
Anti-humaner CCK <sub>2</sub> -Rezeptor SA 16 vom Huhn	siehe (34)
Anti-Kaninchen DAKO EnVision Polymer von der Ziege	DAKO
Anti-phospho-MEK1/2 (Ser 217/221) vom Kaninchen	Cell
	Signaling
Anti-phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr 202/Tyr 204) vom Kaninchen	Cell
	Signaling
Anti-phospho-Raf (Ser 295) vom Kaninchen	Cell
	Signaling
Anti-rabbit IgG, Meerretich-Peroxidase-konjugiert	Cell
	Signaling
Anti-rabbit IgG, Meerrettich-Peroxidase-konjugiert	Cell
	Signaling

## 3.1.8 Substanzen

Aceton	Merck
Agarose	Eurogentec
DAB (Diaminobenzidin) Chromogen	Dako
dNTP-Mix 10 mM	Invitrogen
Entellan	Merck
Ethydiumbromid	Sigma
Hämalaun-Lösung	Merck
Isopropanol	Merck
Oligo dt Primer	Invitrogen
PBS (phosphate buffered saline)	Gibco
Primer (CCK <sub>2</sub> und ß-Actin)	Invitrogen
RNase H	Invitrogen
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen
<i>Taq</i> -Polymerase	Invitrogen
Trypsin-EDTA	Gibco

## 3.1.9 Geräte

8-Kanal-Pipette
Absauggerät Miniport
Agarosegelelektrophoresekammer
Brutschrank
Kamera (Immunzytochemie)
Kamera (PCR)
Lichtmikroskop
Mikrotiterplatten-Reader EL 808

# Multipette Photometer Röntgenfilm-Entwicklungsgerät Curix 160 Röntgenfilmkassette SDS-Gelelektrophoresekammer T3 Thermocycler Werkbank Zentrifuge Sigma 3K30

Eppendorf Servox Biometra Heraeus Leica Polaroid Olympus Bio Tek Instruments Eppendorf Jenway Agfa Rego Bio Rad Biometra Heraeus Braun

## 3.2 Methoden

## 3.2.1 Zellkultur

Für die Experimente wurde die Madin darby canine kidney (MDCK)-Zelllinie eingesetzt. Es handelt sich hierbei um Sammelrohrzellen der Hundeniere. Die MDCK-Zelllinie besteht aus zwei Subtypen, C7 und C11, welche beide den CCK<sub>2</sub>-Rezeptor exprimieren.

Die Zellen wurden in 162cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 25ml MEM M2 bei Standardbedingungen gehalten (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Das Medium wurde 2x/ Woche gewechselt. Innerhalb von einer Woche erreichten die MDCK-Zellen eine Konfluenz von 90-95% und wurden passagiert. Dafür wurden sie mit EDTA-Puffer inkubiert (15min, 37°C), so dass die Zellgrenzen sichtbar wurden. Anschließend wurden sie mit 5ml Trypsin-EDTA inkubiert (15min, 37°C) und danach durch Klopfen auf die Kulturflasche abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit MEM M2 aufgefüllt und für 5min bei 1000x g zentrifugiert. Nach Resuspension mit neuem MEM M2 wurden die Zellen wieder ausgesät.

Für Zählversuche wurden sie in 12-Loch-Platten (3,1cm<sup>2</sup> Kulturfläche), für BrdU-Assays in 96-Loch-Platten (0,36cm<sup>2</sup> Kulturfläche), für Proteinisolierungen in Plastikschalen (10cm<sup>2</sup> Kulturfläche) und für die Immunzytochemie auf Objektträger ausgesät.

## 3.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur selektiven Vervielfältigung einer spezifischen DNA-Sequenz. Dabei wird der gesuchte DNA-Abschnitt durch zwei synthetische Oligonukleotide begrenzt und von einer thermostabilen *Taq*-Polymerase in mehreren Zyklen amplifiziert, in denen sich Denaturierung der Doppelstränge, Primerbindung und Neusynthese regelmäßig wiederholen.

Das PCR-Verfahren wurde benutzt, um die Expression des CCK<sub>2</sub>-Rezeptors in MDCK C7- und C11-Zellen anhand der komplementären DNA (cDNA) nachzuweisen. Die cDNA entsteht durch Umschreiben der gesamten mRNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase und spiegelt somit das Expressionsmuster der Zelle wider.

<u>Herstellung der cDNA:</u> Nach RNA-Isolierung aus MDCK C7- und C11-Zellen mit dem TriReagent-Kit (Molecular Research Center Inc.) nach Gebrauchsanleitung erfolgte die Herstellung der cDNA unter Verwendung des Invitrogen's cDNA-SyntheseKits. Der Reaktionsansatz enthielt 1µg RNA auf 11µl DEPC H<sub>2</sub>O und 1µl Oligo dt-Primer. Nach Inkubation im Biometra T3 Thermocycler für 10min bei 70°C wurde bei 4°C 7µl Reverse-Transkription-Mix ergänzt, bei 42°C erfolgte nach Zugabe von 1µl Superscript II Reverse Transkriptase für 50min die cDNA-Synthese. Nach Inkubation bei 70°C für 10min wurde die RNA unter Zugabe von 1µl RNase H bei 37°C für 20min verdaut.

Durchführung der PCR: Es wurde ein Reaktionsansatz von 71,5µl verwendet mit 32,5µl 10x PCR-Puffer, 26µl Nukleotidtriphosphate (NTPs), 1,625µl *Taq* Polymerase und 11,375µl H<sub>2</sub>O.

Innerhalb von 35 Zyklen wurde im Biometra T3 Thermocycler folgendes Temperaturprofil verwendet: 60sek bei 94°C, 60sek bei 60°C, 120sek bei 72°C. Die folgenden Primer wurden benutzt:

CCK<sub>2</sub>-human 601/1320:

vorwärts 5' CGTGTGCTGCAGTGCGTGCA 3' (= 601 bp)

rückwärts 5' GGTGGTGTAGCTAAGCCTGG 3' (= 1320 bp)

Als Positivkontrolle wurden ß-actin-spezifische Primer eingesetzt:

ß-Actin 249/755:

vorwärts 5' ATCTGGCACCACACCTTCTACA3' (= 249 bp)

rückwärts 5' GCTCATTGCCAATGGTGAT G AC 3' (= 755 bp)

Die PCR-Produkte wurde auf einem 1,5% Ethidiumbromid-Agarosegel aufgetragen und unter UV-Licht fotografiert.

## 3.2.3 Immunzytochemie

Die Immunzytochemie ist eine Methode zum quantitativen mikroskopischen in vitro-Nachweis von antigenen Substanzen in zytologischen Präparaten, welche nach dem immunologischen Prinzip der Sandwich-Technik durch peroxidaseassoziierte Anti-Antikörper sichtbar gemacht werden.

Dieses Verfahren wurde eingesetzt, um mittels spezifischer CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-Antikörper die Expression von CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren in MDCK C7- und C11-Zellen nachzuweisen.

Es wurden Objektträger (OT's) mit 8 Löchern verwendet, in die jeweils 2000 MDCK-Zellen in 40µl MEM M2 ausgesät wurden. Anschließend Kultivierung für 24h in einer Feuchtkammer (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), danach Kultivierung in einer mit MEM M2 gefüllten Schale für weitere 24h (37°C und 5% CO<sub>2</sub>). Danach Fixation der MDCK-Zellen auf den OT's: erst Schwenken der OT's in frischem PBS, dann Halten in reinem Aceton (15min, Raumtemperatur (RT)). Die Löcher wurden mit einem Wachsstift umrandet und die OT's 5min in frischem PBS gespült. Anschließend Inkubation des ersten Antikörpers (45min, RT):

Anti-humaner CCK<sub>2</sub>-Rezeptor SA 16 vom Huhn, verdünnt 1:500 mit 1%BSA in PBS, jeweils 15µl pro Loch. Als Negativkontrolle diente 15µl 1%BSA in PBS ohne Antikörper. OT's wurden 2x für 5min in frischem PBS gewaschen, dann Inkubation des zweiten Antikörpers (45min, RT):

*Anti-Huhn Immunglobulin* Y vom Kaninchen, Peroxidase-konjugiert verdünnt 1:2000 mit 1%BSA/PBS, jeweils 15µl pro Loch. OT's waschen wie oben, anschließend Inkubation des dritten Antikörpers (30min, RT):

Anti-Kaninchen DAKO EnVision Polymer von der Ziege, unverdünnt, jeweils 15µl pro Loch. Waschen wie oben. Auf jedes Loch wurde 20µl DAB Plus-Substratlösung gegeben, 30min bei RT inkubiert und vorsichtig mit Aqua dest abgespült.

Dann Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun: OT's wurden für 1min in Hämalaun gebadet, mit Leitungswasser abgespült und für 5min in Aqua dest gereinigt. Zum

Schluß wurden 4 Tropfen Entellan auf die OT's gegeben und mit Deckgläschen luftblasenfrei verschlossen.

### 3.2.4 Zählversuche

Es sollte die wachstumsvermittelnde Wirkung von Gastrin über den CCK<sub>2</sub>-Rezeptor an MDCK C7- und C11-Zellen untersucht werden. Um die proliferative Wirkung in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis zu beschreiben, wurde Gastrin in Endkonzentrationen von 10<sup>-9</sup> bis 10<sup>-6</sup>M verwendet.

Für die Zählversuche wurden drei 12-Loch-Platten (3,1cm<sup>2</sup> Kulturfläche) verwendet, in die pro Loch 10000 Zellen ausgesät wurden. Die Zellen wurden mit MEM M2 bedeckt und für 24h bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> kultiviert. Dann wurde das Medium abgesaugt und für weitere 24h durch serumfreies MEM M0 ersetzt. So wurden mögliche proliferative Nebeneffekte durch das FCS herausgefiltert und die Zellen in einer Art Mangelzustand optimal auf die nachfolgende Stimulation vorbereitet.

Folgende Stimulationsmedien wurden verwendet:

- MEM M1 mit Gastrin 17-I (human) 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>M

- MEM M1 mit EGF 10<sup>-7</sup>M (Positivkontrolle)

- MEM M1 mit L369,260 10<sup>-6</sup>M (spezif. CCK<sub>2</sub>-R Antag.) und Gastrin 10<sup>-6</sup>M

(zum Beweis, dass das Wachstum CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelt ist)

Das Medium wurde täglich gewechselt. Nach 24h wurde die erste 12-Loch-Platte ausgezählt, nach 48h die zweite, nach 72h die dritte. Dafür wurde in der jeweiligen Platte das Medium aus den Löchern abpipettiert und die Zellen für 10min bei 37°C mit 400µl Trypsin-EDTA bedeckt. Nach Resuspension der abgelösten Zellen mit 600µl MEM M1 und besonders sorgfältigem Mischen wurde 10µl der Zellsuspension 1:1 mit 25%Trypanblau vermischt. Hierbei wurde für jeden Parameter eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Es folgte die mikroskopische Zählung der vitalen nicht blau gefärbten Zellen in Neubauer-Zählkammern, wobei ein Quadrant jeweils ein Volumen von 0,1µl fasste. Es wurden vier Quadranten ausgezählt und davon der Mittelwert gebildet. Die Zellzahl/ml wurde errechnet, indem dieser Mittelwert mit 20000 multipliziert wurde. (Formel: Zellen in allen Quadranten/4 x2 x10000 = Zellzahl/ml)

#### 3.2.5 BrdU- Proliferations-Assay

Mittels BrdU-Assay wird der Einbau von BrdU (5-Bromo-2'desoxy-Uridin) in replizierende zelluläre DNA gemessen. Somit stellt das Verfahren stellt eine indirekte Methode dar, um Zellwachstum nachzuweisen, analog dem Einbau von radioaktiv markiertem (<sup>3</sup>H)-Thymidin in wachsende Zellen.

Der Assay läuft in drei wesentlichen Schritten ab:

- Die Zellkultur wird mit BrdU inkubiert, welches statt Thymidin in die neu synthetisierte DNA eingebaut wird.
- 2. Die Zellen werden fixiert und die DNA denaturiert
- Ein Antikörper gegen BrdU bindet mit seinem Fc-Fragment an das in die neuen DNA-Stränge inkorporierte BrdU; an den Fab-Teil bindet ein Peroxidase-haltiges Substrat, welches eine Farbreaktion katalysiert. Deren Intensität korreliert direkt mit der Menge der synthetisierten DNA beziehungsweise der Zahl der proliferierten Zellen.

Es wurde das CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelte Wachstum von MDCK C7- und C11-Zellen untersucht, nachdem diese 24h mit Gastrin  $10^{-6}$ M stimuliert haben wurden.

Alle verwendeten Spezial-Lösungen und die Versuchsinstruktionen stammen aus dem BrdU- Kit der Fa. Roche.

Für diesen Versuch wurden 96-Loch-Platten (0,36cm<sup>2</sup> Kulturfläche) verwendet, in die pro Loch 3000 Zellen ausgesät wurden. Die Zellen wurden mit 100µl MEM M2 bedeckt und 24h bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> kultiviert. Dann wurde das Medium abgesaugt und für

weitere 24h durch serumfreies Medium ersetzt. So wurden mögliche proliferative Nebeneffekte durch das FCS herausgefiltert.

Folgende Stimulationsmedien wurden verwendet:

- MEM M1 mit Gastrin 17-I (human) 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>M

- MEM M1 mit EGF 10<sup>-7</sup>M (Positivkontrolle)

- MEM M1 mit L369,260 10<sup>-6</sup>M (spezif. CCK<sub>2</sub>-R Antag.) und Gastrin 10<sup>-6</sup>M

(zum Beweis, dass das Wachstum CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelt ist)

- MEM M1 ohne Gastrin (Negativkontrolle)

Jeder Wert wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Zellen wurden 24h bei 37°C stimuliert. Dann wurde in jedes Loch 10µl BrdU Labeling Solution (besteht aus 1:100 BrdU in MEM M1, entspricht pro Loch 10mM BrdU) pipettiert und nochmals für 24h bei 37°C kultiviert. Anschließend wurde das Medium durch vorsichtiges Klopfen auf die umgedrehte Kulturplatte entfernt und die Zellen für 30min bei RT mit 200µl FixDenat-Lösung pro Loch inkubiert. Dadurch wurden die Zellen fixiert und die Doppelstrang-DNA in Einzelstränge zerlegt. So wurden die Bindungsstellen von BrdU freigelegt.

Die FixDenat-Lösung wurde durch vorsichtiges Herausklopfen entfernt und in jedes Loch 100µl anti-BrdU-POD working solution (1:100 in Speziallösung verdünnter BrdU-Antikörper) pipettiert und für 90min bei 37°C inkubiert. Durch dreimaliges Waschen der Löcher mit 200µl Washing Solution wurden ungebundene Antikörperreste entfernt. Nach Zugabe von 100µl/Loch Substratlösung wurde die Kulturplatte für 25min bei RT sanft schüttelnd inkubiert. Es entwickelte sich eine enzymatische Farbreaktion, deren Intensität in einem ELISA-Reader bei 450nm (Referenz-Wellenlänge: 630nm) gemessen wurde.

## 3.2.6 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zum spezifischen Proteinnachweis in Zellen oder im Serum. Ein Proteingemisch wird elektrophoretisch in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das gesuchte Protein wird durch einen spezifischen Antikörper gebunden und mittels Anti-Antikörper nach dem Prinzip eines Immunassays detektiert.

Es wurde die CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelte intrazelluläre Signalkaskade bei den MDCK-Zellen untersucht, dafür wurden spezifische Antikörper gegen die phosphorylierten Formen von Raf, MEK und ERK eingesetzt.

Der gesamte Versuch bestand aus drei Hauptteilen:

- 1. Gastrinstimulation der MDCK-Zellen
- 2. Präparierung von Zellextrakten
- 3. Gelelektrophorese und Blot
- <u>Durchführung der Gastrinstimulation</u>: Pro Zelllinie wurden 5 Schalen (Kulturfläche 10cm<sup>2</sup>) mit jeweils ca 15Mio Zellen ausgesät und mit 10ml MEM M2 bedeckt. Bei einer Konfluenz von 90-95% wurden die Zellen für 72h serumfrei gesetzt. Dann wurden sie mit Gastrin 10<sup>-6</sup>M stimuliert für 30sek, 10min und 30min. Als Positivkontrolle wurde eine Schale für 5min stimuliert mit EGF 10<sup>-7</sup>M, als Negativkontrolle für 5min mit reinem Medium.
- 2. <u>Präparieren von Zellextrakten</u>: Das Stimulationsmedium wurde abgesaugt, Schalen 2x mit kaltem PBS gewaschen und auf Eis gestellt. Alle folgenden Arbeitsschritte fanden im Eis statt. Auf jede Schale wurde 500µl Lysispuffer gegeben, die Zell-Puffer-Suspensionen anschließend in eppendorf-Tubes überführt und bei 4°C 30min geschüttelt, danach 10min bei 4°C zentrifugiert bei 10.000 U/min. Die Überstände wurden abgenommen und in neue Tubes überführt. Anschließend erfolgte die Proteinbestimmung oder die Lagerung bei –20°C, langfristige Lagerung

bei –80°C. Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BCA-Protein-Assay Reagent mit Rinder-Serumalbumin als Standard. Die Extinktionen wurden im Elisareader bei 540nm gemessen, die Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel.

Für die elektrophoretische Auftrennung in Polyacrylamidgelen wurde 50µg von jeder Proteinprobe vermischt mit 1/6 DTT und 1/6 Lämmli-Puffer, anschließend zur Denaturierung 5min auf 100°C erhitzt und vor dem Beladen kurz abzentrifugiert.

3. Gelelektrophorese und Blot: Die Gelkammer wurde mit Alkohol gereinigt und zusammengebaut. In die beiden Platten wurden 10%-Trenngele gegossen, mit Isopropanol überschichtet und für 20min polymerisiert. Dann wurde jeweils ein 4%-Sammelgel überschichtet und für 20min polymerisiert. Die Gele wurden in die Kammer eingespannt und Laufpuffer bis oben hin eingefüllt. Anschließend erfolgte die Probenbeladung der Geltaschen. Die Proteintrennung erfolgte bei 80Volt (15min), dann bei 120Volt (ca 2h). Ihrem Molekulargewicht nach gelangten kleine Proteine schneller nach unten als große, wobei deren Ladung durch vorherige Zugabe von DTT einheitlich negativ war. Für das anschließende Blotten wurden Nitrozellulosemembran und Blottingpaper (Schleicher & Schuell) auf circa 9 x 7cm große Stücke zugeschnitten. 3 Blottingpaper wurden mit Semy-Dry-Puffer durchfeuchtet und luftblasenfrei in das Blotgerät gelegt, darauf die ebenfalls durchfeuchtete Nitrozellulose, dann das Gel und wieder 3x Blottingpaper. Es wurde 50min bei 400mA geblottet. Die Blots wurden über Nacht bei 4°C in 50ml Blockpuffer geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurden sie 3x 5min mit TBS und TBS/Tween bei Raumtemperatur gewaschen und mit dem ersten Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend Waschen wie oben und Inkubation des zweiten Antikörpers für 1h bei Raumtemperatur. Wieder Waschen und Inkubation der ECL-Lösung für 1min. Die Blots wurden in eine Filmkassette gelegt und in der Dunkelkammer entwickelt. Für die Auswertung wurden die Banden eingescannt und ihre Dichte mit dem NIH Image Computerprogramm berechnet. Die weitere Auswertung erfolgte in Microsoft Excel.

## 4. Ergebnisse

## 4.1 Nachweis des CCK<sub>2</sub>-Rezeptors in MDCK-Zellen und humanem Nierenzell-Ca

Diese Arbeit untersucht die proliferative Wirkung und die zu Grunde liegenden intrazellulären Signalwege von Gastrin an MDCK-Zellen, vermittelt über den CCK<sub>2</sub>-Rezeptor. Grundlage für alle Versuche ist der Nachweis, daß der CCK<sub>2</sub>-Rezeptor in MDCK-Zellen exprimiert wird. Dieses konnte mit RT-PCR und Immunzytochemie gezeigt werden.

## 4.1.1 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein Standardverfahren, um spezifische DNA-Sequenzen aus einem Genpool zu vervielfältigen und dadurch nachzuweisen. Mittels RT-PCR konnte die CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-Expression sowohl in C7-, als auch in C11-Zellen gezeigt werden (*Abbildung 4.1*). PCR von TT-Zellen wurde als positive Vergleichskontrolle für den CCK<sub>2</sub>-Rezeptor mitgeführt. Zusätzlich erfolgte die RT-PCR von Operationsresektaten humaner Nierenzellkarzinome dreier Patienten. Als Positivkontrolle für den Versuch wurde ß-Actin verwendet (*Abbildung 4.2*).



Abb. 4.1: PCR mit spezifischen Primern (CCK<sub>2</sub>-human 601/1320)



Abb. 4.2: PCR mit spezifischen Primern (ß-Actin 249/755)

In den MDCK C7- und C11-Zellen konnte die Expression des CCK<sub>2</sub>-Rezeptors nachgewiesen werden. Interessanterweise fanden sich ebenfalls mRNA-Transkripte in allen drei humanen Nierenzellkarzinom-Resektaten.

## 4.1.2 Immunzytochemie

Wir verwendeten spezifische peroxidasekonjugierte Antikörper gegen den membranständigen CCK<sub>2</sub>-Rezeptor. Dafür fixierten wir MDCK C7- und C11-Zellen auf Objektträger und inkubierten sie mit Antikörpern und Anti-Antikörpern nach dem Prinzip einer immunologischen Sandwich-Technik. Zum Schluss erfolgte eine Hintergrundfärbung mit Hämatoxylin. Die so präparierten Objektträger wurden lichtmikroskopisch abfotografiert und als Diapositive gesammelt.

Ziel dieser Methode war es, einen zweiten quantitativen Rezeptornachweis zu erbringen, der direkt optisch erfassbar ist.

Die Detektion mit CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-spezifischen Antikörpern ergab positive Farbsignale bei beiden Zelllinien ohne quantitative Unterschiede zwischen C7 und C11. Die mitgeführten Negativkontrollen ohne CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-Antikörper bestätigen die Validität des Versuches.

Kontrolle CCK<sub>2</sub>-Rezeptor

Abb. 4.3: Immunzytochemische Detektion des CCK<sub>2</sub>-Rezeptors in MDCK C7-Zellen.



Abb. 4.4: Immunzytochemische Detektion des CCK2-Rezeptors in MDCK C11-Zellen.

## 4.2 Proliferation von MDCK-Zellen durch Gastrin

## 4.2.1 Zählversuche

Die MDCK C7- und C11-Zellen wurden 24, 48 und 72h mit Gastrin in Konzentrationen von 10<sup>-6</sup>M bis 10<sup>-9</sup>M stimuliert. Die Ausgangszellzahl war 10000. Die Zellen wurden in Dreifachbestimmung gezählt. Das durch Gastrin verursachte Wachstum wurde verglichen mit dem basalen Zellwachstum.

*MDCK C7:* Durch die Stimulation mit Gastrin  $10^{-6}$ M stieg die Anfangszellzahl von 10000 nach 72h auf 50156 an (p< 0,05). Durch die Stimulation mit EGF  $10^{-7}$ M stieg die Zellzahl von 10000 nach 72h auf 47500 (p< 0,05) (*Abbildung 4.5*).



Abb. 4.5: Zählversuche MDCK C7-Zellen.

*MDCK C11:* Durch die Stimulation mit Gastrin 10<sup>-6</sup>M stieg die Anfangszellzahl von 10000 nach 72h auf 46875 an (p< 0,05). Bei gleichzeitiger Stimulation mit Gastrin und dem CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten L360,260 stieg die Zellzahl von 10000 nur auf 27222 an (p< 0,05). Durch die Stimulation mit EGF 10<sup>-7</sup>M stieg die Zellzahl von 10000 nach 72h auf 59791 an (p< 0,05) (*Abbildung 4.6*).



Abb. 4.6: Zählversuche MDCK C11-Zellen

## 4.2.2 BrdU-Proliferationsassays

Mittels BrdU-Uptake wurde ein zweiter quantitativer Proliferationsnachweis durchgeführt. Gemessen wurde das eingebaute BrdU (5-Bromo-2'desoxy-Uridin) in replizierende zelluläre DNA.

*MDCK C7:* Die Zellen wurden 24h mit Gastrin 10<sup>-6</sup>M stimuliert. Dann wurde für weitere 24h das BrdU-Label hinzugegeben. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nicht mit Gastrin stimuliert, aber ebenfalls mit BrdU gelabelt wurden. Der Einbau von BrdU in neu synthetisierte DNA wurde quantitativ gemessen und mit dem Wert von unstimulierten Zellen verglichen. Als Positivkontrolle diente EGF 10<sup>-7</sup>M. Es wurden 5 Versuche jeweils in Dreifachbestimmungen durchgeführt und daraus die Mittelwerte berechnet.

Es zeigte sich nach Gastrinstimulation ein Anstieg der DNA-Synthese um den Faktor 1,3 (p< 0,05). Unter zusätzlicher Gabe des  $CCK_2$ -Rezeptor-Antagonisten L-365,260 sank die DNA-Synthese um den Faktor 0,9. EGF bewirkte eine Zunahme der DNA-Synthese um den Faktor 1,2 (p< 0,05) (*Abbildung 4.7*).



Abb. 4.7: Relative Zunahme des BrdU-Uptakes im Vergleich mit unstimulierten C7-Zellen

*MDCK C11:* Die Proliferationsrate der Zellen, die mit Gastrin stimuliert wurden, war im Vergleich zu unstimulierten Zellen um den Faktor 1,7 erhöht (p< 0,05). Das Wachstum der Zellen, die mit Gastrin und CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten stimuliert wurden, ist dagegen nur um den Faktor 1,08 gegenüber unstimulierten Zellen angestiegen. Mit EGF stimulierte Zellen hatten ein 1,6-fach erhöhtes Wachstum gegenüber nicht stimulierten Zellen (p< 0,05) (*Abbildung 4.8*).



Abb. 4.8: Relative Zunahme des BrdU-Uptakes im Vergleich mit unstimulierten C11-Zellen

## 4.3 Vermittlung der Gastrinwirkung über MAPK-Kaskade

Weitergehende Versuche sollten die intrazellulären Mechanismen untersuchen, die der CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelten Zellproliferation zu Grunde liegen. Dazu wurden in der Western Blot-Technik spezifische Antikörper gegen die phosphorylierten Formen von Raf, MEK und MAPK eingesetzt.

Es wurden Proteinextrakte von Zellen hergestellt, die unterschiedlich lange (30sek, 10min, 30min) mit Gastrin stimuliert wurden. Dadurch sollte festgestellt werden, wie lange es dauert, bis die maximale intrazelluläre Antwort erreicht ist.

Die Stimulation des CCK<sub>2</sub>-Rezeptors führte bei beiden Zelllinien C7 und C11 zu einer zeitabhängigen Phosphorylierung der Enzyme Raf, MEK und MAPK. Für alle Signalproteine galt, dass das Maximum in den ersten 10min der Gastrinstimulation lag. Nach 30min Stimulation nahm die MAPK-Phosphorylisierung wieder ab, jedoch nicht unter den unstimulierten Vergleichswert.

#### 4.3.1 Raf-Phosphorylierung

*MDCK C7:* Durch Gastrin wird, vermittelt über CCK<sub>2</sub>-Rezeptor, das Signalprotein Raf vermehrt phosphoryliert. p-Raf war auch in unstimulierten Zellen nachweisbar, stieg aber nach 30sek Gastrinstimulation auf das 2,3-fache gegenüber dem Ausgangswert an (p< 0,05). Nach 10min (p< 0,05) und 30min (p< 0,3) Stimulation ergab sich nur noch ein Anstieg auf das 1,6-fache des Ausgangswertes. Die Stimulation mit EGF ergab eine 2,2-fach erhöhte Raf-Phosphorylierung gegenüber dem unstimulierten Wert (p< 0,05) (*Abbildung 4.9*).



Abb. 4.9: Zeitabhängige Raf-Phosphorylierung nach Gastrinstimulation in C7-Zellen (n=8)



Abb. 4.10: Beispiel-Blot für p-Raf nach Gastrinstimulation in C7-Zellen

*MDCK C11:* Gastrin bewirkt auch in C11-Zellen eine Phosphorylierung von Raf. Nach 30sek kann p-Raf um das 1,8-fache erhöht gemessen werden (p< 0,05), nach 10min ist das Maximum mit 1,9-fachem Anstieg erreicht (p< 0,05). Bei 30min wiederum Absinken auf 1,5x des unstimulierten Wertes (p< 0,01) (*Abbildung 4.11*).



Abb. 4.11: Zeitabhängige Raf-Phosphorylierung nach Gastrinstimulation bei C11-Zellen (n=4)



Abb. 4.12: Beispiel-Blot für p-Raf nach Gastrinstimulation in C11-Zellen

Das Maximum der Raf-Aktivierung ist bei beiden Zelllinien C7 und C11 innerhalb der ersten 10min der Gastrinstimulation erreicht. Nach 30min klingt die intrazelluläre Raf-Antwort bei beiden Zelllinien wieder ab.

## 4.3.2 MEK-Phosphorylierung

*MDCK C7:* Gastrin stimuliert bei C7-Zellen die Phosphorylierung von MEK. Nach 30sek 2,5-facher Anstieg im Vergleich zum unstimulierten Wert (p< 0,05). Maximum bei 10min mit 3,3-fachem Anstieg (p< 0,05). Bei 30min nur noch Verdoppelung des Ausgangswertes (p< 0,1). EGF bewirkt mit einem Anstieg um den Faktor 5 ebenfalls eine positive intrazelluläre MEK-Antwort (p< 0,05) (*Abbildung 4.13*).



Abb. 4.13: Zeitabhängige MEK-Phosphorylierung nach Gastrinstimulation bei C7-Zellen



Abb. 4.14: Beispiel-Blot für p-MEK nach Gastrinstimulation bei C7-Zellen

*MDCK C11:* Gastrin stimuliert auch bei den C11-Zellen die Phosphorylierung von MEK. Nach 10min 2,9-facher Anstieg (p<0,05). EGF bewirkt mit einem Anstieg um den Faktor 3 (p<0,05). Nicht signifikant war ein 3,8-facher Anstieg nach 30sek sowie ein 3,3-facher Anstieg nach 30min (p<0,5) (*Abbildung 4.15*).



Abb. 4.15: Zeitabhängige MEK-Phosphorylierung nach Gastrinstimulation bei C11-Zellen (n=5)



Abb. 4.16: Beispiel-Blot für p-MEK nach Gastrinstimulation bei C11-Zellen

## 4.3.3 MAPK-Phosphorylierung

*MDCK C7:* Durch Gastrin wird das Signalprotein MAPK vermehrt phosphoryliert. Nach 30sek Gastrinstimulation Anstieg auf das Doppelte gegenüber dem Ausgangswert (p<0,05). Das Maximum liegt bei 10min mit einem 2,3-fachen Anstieg gegenüber dem unstimulierten Wert (p<0,05). Die Zellantwort klingt nach 30min wieder ab, hier nur noch Erhöhung um das 1,9-fache (p<0,2). Die Stimulation mit EGF ergab eine 1,1-fach erhöhte MAPK-Aktivierung gegenüber dem unstimulierten Wert (p<0,05) (*Abbildung 4.17*).



Abb. 4.17: Zeitabhängige MAPK-Phosphorylierung nach Gastrinstimulation bei C7-Zellen



Abb 4.18: Beispiel-Blot für p-MAPK nach Gastrinstimulation bei C7-Zellen

*MDCK C11:* Gastrin bewirkt auch in C11-Zellen eine Phosphorylierung von MAPK. Nach 30sek kann p-MAPK um das 1,2-fache erhöht gemessen werden (p< 0,05), nach 10min ist das Maximum mit 1,4-fachem Anstieg erreicht (p< 0,05). Bei 30min wiederum Absinken auf das 0,9-fache des unstimulierten Wertes (p< 0,6). Die Stimulation mit EGF bewirkte eine Erhöhung um den Faktor 1,5 (p< 0,05) (*Abbildung 4.19*).



Abb. 4.19: Zeitabhängige MAPK-Phosphorylierung nach Gastrinstimulation bei C11-Zellen



Abb. 4.20: Beispiel-Blot für p-MAPK nach Gastrinstimulation bei C11-Zellen

Sowohl bei C7- als auch bei C11-Zellen kommt es nach 10min zur max. MAPK-Aktivierung.

## 5. Diskussion

## 5.1 CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-Expression

CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren werden beim Menschen in zahlreichen Organen des Gastrointestinaltraktes, im Gehirn und in verschiedenen Malignomen (u.a. kolorektale Karzinome, kleinzelliges Bronchialkarzinom, Astrozytome, Ovarkarzinome) exprimiert (1, 6, 8-10, 15, 19-22, 25, 26, 28, 30, 31, 51). Die höchste Rezeptordichte besteht wahrscheinlich im Gehirn (51).

Die Expression von CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren in der menschlichen Niere ist 1995 von Wank et al. im Rahmen der molekularen Klonierung der Cholezystokininrezeptoren entdeckt worden (9). Interessanterweise ist die CCK<sub>2</sub>-Rezeptordichte in der Niere größer als im Magen als dem klassischen Zielorgan von CCK und Gastrin (1, 9). 1998 konnten de Weerth et al CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-Transkripte in der Niere des Meerschweinchens nachweisen. Immunzytochemische Untersuchungen an histologischen Schnitten zeigten, dass der Rezeptor an Sammelrohren, Glomeruli und Mesangiumzellen lokalisiert ist (33). Diese Befunde wurden durch die Untersuchung der cDNA aus spezifischen Anteilen der Niere bestätigt. Hier zeigte sich eine prädominierende Expression des CCK<sub>2</sub>-Rezeptors an Tubuli und Glomeruli (34).

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde in dieser Arbeit angenommen, dass der CCK<sub>2</sub>-Rezeptor neben der normalen Niere auch in Nierenzellkarzinomen des Menschen vorkommt. Diese Annahme konnte mittels RT-PCR-Untersuchungen bestätigt werden. Dieses steht in Kontroverse zu Ergebnissen von Reubi et al., die den CCK<sub>2</sub>-Rezeptor in zahlreichen humanen Tumoren, nicht jedoch im Nierenzell-Ca nachweisen konnten (31). Der Grund für die Diskrepanz besteht wahrscheinlich in der größeren Sensitivität der RT-PCR im Vergleich zu der von Reubi angewandten Rezeptor-Autoradiographie. Die Funktion der CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren an der Niere ist noch nicht genau bekannt, bisherige Untersuchungen weisen jedoch auf einen CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelten Wachstumseffekt hin. Bisher liegen zuverlässige Daten für proximale Tubuluszellen

(33), eine humane Nephroblastomzellinie (14) und eine humane embryonale Nierenzellinie (35) vor. Neben den Hinweisen auf eine Funktion als Wachstumsfaktor sind CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren an der Regulation des Säure-Basen-Haushaltes beteiligt. An isoliert perfundierten Nieren konnte gezeigt werden, dass Gastrin über den CCK<sub>2</sub>-Rezeptor eine Änderung der Natrium- und Kaliumabsorption über Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasen verursacht (36).

Diese Ergebnisse waren Anlass für die vorliegende Arbeit, die Funktion der CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren in der Niere hinsichtlich Proliferation und die dabei zu Grunde liegenden Signaltransduktionswege weiter zu charakterisieren. Dafür wurde die MDCK-Zelllinie von Sammelrohrzellen des Hundes verwendet.

Zunächst wurde die Expression des CCK<sub>2</sub>-Rezeptors in den MDCK-Zellen auf m-RNAund Proteinebene bestätigt.

## 5.2 Gastrin als Wachstumsfaktor

Gastrin hat auf multiple Zellen und Gewebe einen wachstumsstimulierenden Effekt über den CCK<sub>2</sub>-Rezeptor (1, 10, 13, 14, 16, 17, 35, 45, 46, 52, 53)

Am besten untersucht sind hierbei Gewebe und Zellen des Gastrointestinaltraktes, insbesondere die Magen- und Kolonschleimhaut (1, 10, 13, 17, 45, 46, 52, 53). Klinisch relevant ist vor allem die Gastrin-bedingte Proliferation von ECL-Zellen des Magenepithels: hypergastrinämische Zustände, (zum Beispiel in Folge eines Zollinger-Ellison-Syndroms oder einer chronisch-atrophen Gastritis), können zu ECL-Zellhyperplasien und u.U. zu der Entwicklung von Magenkarzinoiden führen (10). Dies ist auch in Tiermodellen gezeigt worden. Bei dem afrikanischen Nagetier Mastomys natalensis konnten ECL-Zell-Karzinoide sogar durch physiologische Gastrinkonzentrationen induziert werden (10). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Gastrin bei MDCK-Zellen Wachstum induziert und dieser Effekt durch den selektiven CCK<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten L-365,260 inhibiert wird. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass Gastrin auf Nierenepithelzellen von Säugetieren und Menschen einen proliferativen Effekt hat.

Vorstellbar wäre auch, dass Gastrin über den CCK<sub>2</sub>-Rezeptor das Wachstum von Nierentumoren induziert. Hierzu passen die Ergebnisse von Blackmore et al., die Gastrin 1994 als Wachstumsfaktor des humanen Nephroblastoms ("Wilms"-Tumor) postulierten (14). Bierkamp et al. zeigten anhand von immunzytochemischen Untersuchungen und Proteinassays, dass MDCK-Zellen nach Gastrinstimulation ihre interzelluläre Adhärenz verloren und, analog maligne transformierter Zellen, entdifferenzierten. Diese Effekte waren mit dem selektiven CCK<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten RPR101048 antagonisierbar (16). Diese Daten legen nahe, dass Gastrin über den CCK<sub>2</sub>-Rezeptor in der Lage ist, normale Nierenepithelzellen maligne zu transformieren und bei der Karzinogenese von renalen Malignomen mitzuwirken. Gastrin könnte eine wichtige Rolle bei der Progredienz von Nierentumoren spielen.

In diesem Zusammenhang wäre es vorstellbar, dass CCK<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten eine neue Therapieoption zur antiproliferativen Behandlung von Tumoren der Niere darstellen könnten.

In den letzten Jahren konnten Tumore verschiedener Entitäten dadurch ausgewiesen werden, dass sie, im Vergleich mit gesundem Gewebe, eine Überexpression von Peptidhormonrezeptoren zeigen (54), z.B. Somatostatinrezeptoren in neuroendokrinen Tumoren und kleinzelligem Bronchialkarzinom (55), Bombesinrezeptoren u.a. in Prostatakarzinomen und Gastrinomen (56), CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren u.a. in ECL-Zell-Karzinoiden (10).

Bekannt ist, dass im humanen Nierenzellkarzinom (NCC) Bombesinrezeptor-Subtypen wie Gastrin-releasing peptide (GRP)-Rezeptor und Bombesin<sub>3</sub>-Rezeptor exprimiert werden (56). Der GRP-Rezeptor ist in Nierenepithelzellen und Endothelzellen des NCC

vorhanden (56, 57). Er vermittelt eine Proliferation der Tumorzellen (56), nach neueren Daten stimuliert er auch die Tumorangiogenese (57). Es ist vorstellbar, dass CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren wie die verwandten GRP-Rezeptoren das Tumorwachstum in NCC's anregen. Weitere Untersuchungen am Tiermodell, z.B. mit Knockout-Mäusen, könnten diesen Punkt klären.

In dieser Arbeit wurde das erste Mal gezeigt, dass humane Nierenzellkarzinome den CCK<sub>2</sub>-Rezeptor exprimieren. Es wäre vorstellbar, dass sie in Zukunft als Zielgewebe von radioaktiv gelabelten Gastrinderivaten bei der Tumordiagnostik und –therapie eine Rolle spielen. In einer kürzlich erschienenen Publikation von Nock et al. wurden drei neue (99m)Tc-gelabelte Minigastrin-Analoga präsentiert, die eine hohe Affinität zu CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren hatten und sich sowohl in vitro als auch in vivo gut zur bildgebenden Tumordiagnostik eigneten. Als CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-exprimierende Tumorentität wurde die AR4-2J Zelllinie verwandt (58). Der Einsatz von radioaktiv gelabelten Peptiden erfährt steigende Bedeutung in der Onkologie, wenngleich das "Octreoscan" mit (111)In-DTPA-Oktreotid zur Diagnostik von neuroendokrinen Tumoren bislang das einzige in der klinischen Routine eingesetzte Verfahren ist (55). Dennoch kommt eine Vielzahl von Rezeptoren u.v.m.), die sich momentan im präklinischen Stadium befinden. Erste klinische Studien mit CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren als Targets fäscht mit CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren als Targets fös.

## 5.3 Signaltransduktionswege für Gastrin

Die bisherigen Untersuchungen zur Aufklärung der molekularen Mechanismen, die durch die Gastrin-CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-Interaktion in Zellen ausgelöst werden und für die Proliferation verantwortlich sind, haben gezeigt, dass es hierbei zelltypspezifische Unterschiede gibt: in vielen Zellen wird die proliferative Wirkung von Gastrin über MAP-Kinasen vermittelt, so z.B. in humanen AGS-Magentumor-Zellen (47), in ECL-Zellen von Mastomys natalensis (11) und in AR4-2J-Pankreasazinus-Zellen der Ratte (31, 42, 45, 46, 59). Andere Zellen verfügen über MAP-Kinasen-unabhängige Signalwege, so z.B. GH<sub>3</sub>-Hypophysenadenomzellen der Ratte, die über das Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-System reguliert werden (46).

Wir bestimmten in MDCK-Zellen die phosphorylierten Formen von MAP-Kinase-Kinase-Kinase (Raf), MAP-Kinase-Kinase (MEK oder ERK-Kinase) und p44/42 MAP-Kinase (ERK1/2), nachdem wir sie unterschiedlich lange (30sek, 10min, 30min) mit Gastrin stimuliert hatten. Es zeigte sich eine zeitabhängige Aktivierung von Raf, MEK und MAPK, die in den ersten 10 Minuten zunahm und nach 30 Minuten wieder zurückging. Auch die unstimulierten Zellen zeigten eine basale Aktivierung, die durch Gastrinstimulation signifikant gesteigert wurde.

Dies weist darauf hin, dass die Gastrin-induzierte Proliferation von Nierenepithelzellen über die Aktivierungskaskade Raf-MEK-MAPK vermittelt wird.

Die ERK-Aktivierung durch Gastrin führt als Endpunkt der intrazellulären Signaltransduktion zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Elk-1 und Sap-1a (60) und zur Induktion von "early response"-Genen (45, 50). Es sind unterschiedliche Wege beschrieben worden, auf welche Weise die ERK's durch Gastrin aktiviert werden, z.B. direkt über die Proteinkinase C oder indirekt über eine Phosphorylierung von zwischengeschalteten Proteinen wie Pyk-2, Src und Shc (10, 43, 46). Eine weitere Möglichkeit ist die ERK-Phosphorylierung nach Transaktivierung eines EGF-Rezeptors:

Tsutsui et al. zeigten 1999, dass Gastrin in Magenepithelzellen der Ratte die Bildung eines "Heparin Binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor" induziert, der an den EGF-Rezeptor derselben oder benachbarten Zelle bindet und diesen transaktiviert (12, 61, 62) (*Abbildung 5.1*).

Weitere Untersuchungen an MDCK-Zellen wären nötig, um zu klären, auf welche Weise die ERK's aktiviert werden und ob eine EGF-Rezeptor-Transaktivierung daran beteiligt ist.



Abb. 5.1: EGF-Rezeptor-Transaktivierung durch Gastrin. *Erklärung siehe Text. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis.* 

#### 5.4 Gastrin in der Niere

Die Entdeckung von CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren in der Niere durch die Arbeitsgruppe von de Weerth et al. (1998) war der erste Hinweis dafür, dass das Peptidhormon Gastrin eine Funktion an der Niere haben könnte. Die Rezeptoren waren an Sammelrohren, Glomeruli, Tubuli und Mesangium der Niere lokalisiert und unterschieden sich in ihren funktionellen und pharmakologischen Eigenschaften nicht von CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren des Hirns oder Magens (33, 34). Interessanterweise haben CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren in der Niere eine höhere Dichte als im Magen als dem klassischen Zielorgan dieser Rezeptoren (36).

Welche Effekte die CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren an der Niere vermitteln, ist noch weitestgehend ungeklärt. Im Folgenden werden die bislang bekannten Funktionen von CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren in der Niere nach dem jetzigen Wissensstand zusammengefasst:

## 5.4.1 Proliferation

Wie schon oben erläutert, zeigen die hier vorgelegten Untersuchungen an MDCK-Zellen gemeinsam mit den bereits veröffentlichten Studien an MCT-Zelllen, HEK-Zellen und humanen Nephroblastomzellen, dass Gastrin ein Wachstumsfaktor an der Niere ist (33, 35, 14). Die bisherigen Daten weisen darauf hin, dass Gastrin sowohl an gesundem Nierenepithel, als auch an malignem Nierengewebe über den CCK<sub>2</sub>-Rezeptor Zellwachstum anregt (14, 33, 35). Darüber hinaus besteht die Vermutung, dass Gastrin an der malignen Transformation von gesunden Nierenepithelzellen in entdifferenzierte Zellen beteiligt ist (16).

#### 5.4.2 Elektrolythaushalt

Eine wichtige Gemeinsamkeit von Niere und Gastrointestinaltrakt ist die Regulierung von Stoffwechselvorgängen (wie Resorption, Sekretion, Säure/Base-Haushalt) über strukturell ähnliche enzymatische Ionenpumpen, die durch Hormone, Transmitter und Zytokine kontrolliert werden. Im Gastrointestinaltrakt interagiert Gastrin mit H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-

ATPasen von Parietalzellen, deren Aktivierung zur Bildung von Magensäure führt. Im Dünndarm bewirkt eine Gastrin-induzierte Hemmung von Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasen eine Verminderung der intestinalen Na<sup>+</sup>-Absorption und Erhöhung der K<sup>+</sup>-Sekretion (36, 63).

In der Niere sind die meisten Ionenpumpen an Tubuli und Sammelrohren Iokalisiert (36), welches auch die Strukturen sind, die sich in cDNA-Untersuchungen der Rattenniere als Haupttranskriptionsorte von CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren ausgewiesen hatten (34). Die Arbeitsgruppe von von Schrenck et al. bestätigte 2000 die Hypothese, dass Gastrin, analog zum Gastrointestinaltrakt, auch mit renalen Ionenpumpen interagiert. In Versuchen an isoliert perfundierten Rattennieren bewirkte Gastrin über den CCK<sub>2</sub>-Rezeptor eine Verminderung der Kalium- und Natriumabsorption sowie eine Reduktion der renalen Perfusion (36).

Die Gastrin-induzierte Verminderung der Natriumresorption passt zu Daten von Unwin et al., die schon 1990 einen "direkten tubulären natriuretischen Effekt" von CCK-8 postulierten (63).

Es ist wahrscheinlich, dass Gastrin diese Elektrolytveränderungen über eine Hemmung von renalen Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasen vermittelt, analog zur Wirkungsweise im GI-Trakt.

## 5.4.3 Niereninsuffizienz

Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CRF) kommt es zu einer messbaren Erhöhung des Serum-Gastrinspiegels. Daneben sind weitere Peptidhormone wie CCK, Sekretin, Somatostatin, Glukagon und Neurotensin erhöht (63-65). Ursache ist eine bei CRF verminderte renale Elimination von Peptidhormonen. Dabei korreliert der Grad der Niereninsuffizienz (messbar als Höhe der Serum-Kreatininkonzentration) mit der Höhe der Gastrinkonzentration im Serum (64). Diese Hypergastrinämie kann bei Patienten mit CRF zur Entwicklung einer peptischen Ulkuskrankheit führen (65). Daneben beeinflussen Gastrin und andere bei CRF erhöhte Peptidhormone die Motilität des Gastrointestinaltraktes, was zu Refluxproblemen,

Magenentleerungsstörungen und Erbrechen führen kann (65). Neben Gastrin ist auch das Progastrin-releasing peptide (ProGRP), ein Marker für das kleinzellige Bronchialkarzinom, bei Patienten mit CRF häufig "falsch positiv" erhöht (66).

## 5.5 Ausblick

Die Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, dass die renal-epithelialen MDCK-Zellen durch Gastrin und den CCK<sub>2</sub>-Rezeptor proliferieren. Der Proliferation liegt eine Aktivierung von ERK-Signaltransduktionsproteinen zugrunde. Die Ergebnisse legen nahe, dass Gastrin eine Funktion als Wachstumsfaktor an der Niere hat. In weiterführenden Untersuchungen sollte geklärt werden, ob sich diese Ergebnisse auch im Tiermodell unter in vivo-Bedingungen verifizieren lassen. Die weitere Aufklärung der zugrundeliegenden Signaltransduktionswege sollte oberhalb der ERK-Aktivierung fokussiert werden und herausfinden, welche Signalwege der Rezeptoraktivierung direkt nachgeschaltet sind und ob z.B. eine EGF-Rezeptor-Transaktivierung beteiligt ist.

Der CCK<sub>2</sub>-Rezeptor konnte erstmalig in humanen Nierenzell-Karzinomen nachgewiesen werden. Ob sich hieraus eine neue diagnostische oder therapeutische Option für das Nierenzell-Karzinom ergibt (ähnlich z.B. dem Octreoscan bei neuroendokrinen Tumoren), kann erst nach weiterer intensiver experimenteller und klinischer Forschung geklärt werden.

## 6...Zusammenfassung

Mitte der neunziger Jahre konnte gezeigt werden, dass CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren in der humanen Niere in hoher Anzahl exprimiert werden. Im Tiermodell konnten Tubuli und Sammelrohre als prädominierende renale Strukturen für den CCK<sub>2</sub>-Rezeptor ausgewiesen werden. Die Funktion des CCK<sub>2</sub>-Rezeptors am Zielorgan Niere ist noch nicht genau bekannt. Bisherige in vitro-Untersuchungen an renalen Zelllinien weisen darauf hin, dass Gastrin über den CCK<sub>2</sub>-Rezeptor in der Niere Wachstum induziert. Die Gastrin-abhängige Proliferation von G401-Zellen, einer Zellinie des humanen Nephroblastoms ("Wilms"-Tumor), legt nahe, dass auch Tumore der Niere in ihrem Wachstum durch Gastrin beeinflusst werden können.

In dieser Arbeit wurden heterologe MDCK-Zellen als Modell von Zwischenzellen und Hauptzellen des Sammelrohres auf ihre Gastrin-induzierte und CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelte Proliferationsantwort hin untersucht.

Anhand von RT-PCR und Immunzytochemie konnte gezeigt werden, dass MDCK-Zellen den CCK<sub>2</sub>-Rezeptor exprimieren.

Die Stimulation mit Gastrin führte zu einer signifikanten Zunahme der absoluten Zellzahl bei MDCK C7- und C11-Zellen. Dieser Effekt war durch den selektiven CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten L365,260 inhibierbar. Ein zusätzlich durchgeführter quantitativer Proliferationsnachweis mittels BrdU-Einbau in replizierende DNA bestätigte die Ergebnisse.

Zur Analyse der hierbei beteiligten Signaltransduktion wurden die phosphorylierten Proteine der MAPK-Kaskade mit der Western Blot-Technik detektiert. Die Stimulation des CCK<sub>2</sub>-Rezeptors führte bei den MDCK-Zellen zu einer zeitabhängigen Phosphorylierung von Raf, MEK und MAPK.

Zusätzlich konnte erstmalig der CCK<sub>2</sub>-Rezeptor im humanen Nierenzell-Karzinom nachgewiesen werden

Die Ergebnisse zeigen, dass die Niere zu den Organen gezählt werden muss, in denen Gastrin über den CCK<sub>2</sub>-Rezeptor Effekte entfaltet. Der hier implizierte Zusammenhang zwischen Gastrin und Nierenzellwachstum könnte eine weiter gefasste Bedeutung bei der Pathophysiologie oder –genese des humanen Nierenzellkarzinoms haben. Da gezeigt worden ist, dass diese Tumore CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren präsentieren, könnten sie als Zielgewebe von radioaktiv gelabelten Gastrinderivaten bei der Tumordiagnostik und - therapie eine Rolle spielen. CCK<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten könnten als neue Therapiemöglichkeit bei Nierentumoren klinische Relevanz erfahren.

## 7. Literaturverzeichnis

- 1 de Weerth A, Bläker M, von Schrenck T. (1999) Receptors for cholecystokinin and gastrin. *Gastroenterology*.**37**: 389-401
- 2 Reeve JR, Eysselein VE Jr, Ho FJ et al. (1994) Natural and synthetic CCK-58. Novel reagents for studying cholecystokinin physiology. *Ann N Y Acad Sci* **713**: 11-21
- 3 Dockrey GJ, Debas HT, Walsh JH, Grossman MI. (1975) Molecular forms of gastrin in antral mucosa and serum of dogs. *Proc Soc Exp Biol Med.* **149**: 550-3
- 4 Jensen RT, Lemp GF, Gardner JD. (1982) Interactions of COOH-terminal fragments of cholecystokinin with receptors on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J Biochem* **257**: 5554-9
- 5 Pavel M, Hensen J. (2000) Verdauungsorgane und Endokrinologie. In: Hahn EG, Riemann JF (Hrsg) Besondere Aspekte der klinischen Gastroenterologie. Thieme (Klinische Gastroenterologie, Bd II, S 1948-57)
- 6 Soll AH, Amirian DA, Thomas LP, Reedy TJ, Elashoff JD. (1984) Gastrin receptors on isolated canine parietal cells. *J Clin Invest.* **73**: 1434-47
- 7 Grider JR, Makhlouf GM. (1987) Regional and cellular heterogenity of cholecystokinin receptors mediating muscle contraction in the gut. *Gastroenetrolog.* **92**: 175-80
- 8 Grider JR, Makhlouf GM. (1990) Distinct receptors for cholecystokinin and gastrin on muscle cells of stomach and gall bladder. *Am J Physiol*. **259**: G184-G190
- 9 Wank SA. (1995) Cholecystokinin receptors. A. J Physiol. 269: G628-G646
- 10 Rozengurt E, Walsh JH. (2001) Gastrin, CCK, signaling and cancer. *Annu Rev Physiol.* **63**: 49-76
- 11 Kinoshita Y, Nakata H, Kishi K, Kawanami C, Sawada M, Chiba T. (1998) Comparison of the signal transduction pathways activated by gastrin in enterochromaffin-like and parietal cells. *Gastroenterol* **115**: 93-100
- 12 Miyazaki Y, Shinomura Y, Tsutsui S, Zushi S, Higashimoto Y, Kanayama S, Higashiyama S, Taniguchi N, Matsuzawa Y. (1999) Gastrin induces Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor in Rat Gastric Epithelial Cells Transfected With Gastrin Receptor. *Gastroenteology* **116**: 78-89
- 13 Ryberg B, Axelson J, Hakanson et al. (1990) Trophic effects of continous infusion of (Leu 15)-gastrin-17 in the rat. *Gastroenterology* **98**: 33-3
- 14 Blackmore M, Doherty E, Manning JE, Hirst BH. (1994) Autocrine growth stimulation of human renal Wilms' tumour G401 cells by a gastrin-like peptide. *Int J Cancer.* **57**: 385-91
- 15 Schaer, JC, Reubi JC. (1999) High gastrin and cholecystokinin (CCK) gene expression in human neuronal, renal, and myogenis stem cell tumors: comparison with CCK-A and CCK-B receptor contents. *Journal of Clinical Endocrinoloy and Metabolism* 84: 233-39
- 16 Bierkamp C, Kowalski-Chauvel A, Dehez S, Fourmy D, Pradayrol L, Seva C. (2002) Gastrin mediated cholecystokinin-2 receptor activation induces loss of cell adhesion and scattering in epithelial MDCK cells. Oncogene 21: 7656-7670
- 17 Koh TJ. Extragastric effects of gastrin gene knock-out mice. (2002) *Pharmacol Toxicol.* **91(6)**: 368-74

- 18 de Weerth A, Pisegna JR, Huppi K, Wank SA. (1993) Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of the human cholecystokinin type A receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* **194**: 811-8
- 20 Wank SA, Harkins R, Jensen RT, Shapira H, de Weerth A, Slattery T. (1992) Purification, molecular cloning, and functional expression of the cholecystokinin receptor from rat pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA.* **89**: 3125-3129
- 21 Wank SA, Pisegna JR, de Weerth A. (1992) Brain and gastrointestinal cholecystokinin receptor family: structure and fuctional expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* **89**: 8691-5
- 22 Kopin AS, Lee YM, McBride EW et al. (1992) Expression cloning and characterization of the canine parietal cell gastrin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. **89**: 3605-9
- 23 Saito A, Goldfine ID, Williams JA. (1981) Characterization of receptors for cholecystokinin and related peptides in mouse cerebral cortex. *J Neurochem.* **37**: 483-90
- 24 Sankaran H, Goldfine ID, Deveney CW, Wong KY, Williams JA. (1980) Binding of cholecystokinin to high affinity receptors on isolated rat pancreatic acini. *J Biol Chem.* **255**: 1849-53
- 25 Bitar, KN, Makhlouf GM. (1982) Receptors on smooth muscle cells: characterization by contraction and specific antagonists. *Am J Physiol.* **242**: G400-407
- 26 Von Schrenck T, Moran TH, Heinz-Erian P, Gardner JD, Jensen RT. (1988) Cholecystokinin receptors on gallbladder muscle and pancreatic acinar cells: a comparative study. *Am J Physiol.* **255**: G512-21
- 27 Cox KL, von Schrenck T, Moran TH, Gardner JD, JensenRT. (1990) Characterization of cholecystokinin receptors on the sphincter of Oddi. *Am J Physiol.* **259**: G873-81
- 28 Meyer MB, Werth BA, Beglinger C et al. (1989) Role of cholecystokinin in regulation of gastrointestinal motor functions. *Lancet.* **2**: 12-5
- 29 Rattan S, Goyal RK. (1986) Structure-activity relationship of subtypes of cholecystokinin receptors in the cat lower esophageal sphicter. *Gastroenterology*. **90**: 94-102
- 30 Crawly JN. (1991) Cholecystokinin-dopamine interactions. Trend Pharmacol Sci. 12: 232-6
- 31 Reubi JC, Schaer JC, Waser B. (1997) Cholecystokinin (CCK)-A and CCK-B/gastrin receptors in human tumors. *Cancer Res.* **57**: 1377-86
- 32 Daulhac L, Kowalski-Chauvel A, Pradayrol L, Vaysse N, Seva C. (1997) Ca<sup>2+</sup> and protein kinase C-dependent mechanisms involved in gastrin-induced Shc/Grb2 complex formation and P44-mitogen-activated protein kinase activation. *Biochem J.* **325**: 383-389
- 33 Mc Williams DF, Watson SA, Crosbee DM, Michaeli D, Seth R. (1998) Coexpression of gastrin and gastrin receptors (CCK-B and delta CCK-B) in gastrointestinal tumour cell lines. Gut 42: 795-798
- 34 de Weerth A, Jonas L, Schade R et al. (1998) Gastrin/cholecystokinin type B receptors in the kidney: Molecular, pharmacological and functional characterization and localization. *Eur J Clin Invest.* **28**: 7592-601
- 35 von Schrenck T, de Weerth A, Bechtel S et al. (1998) Evidence for CCK-B receptors in the kidney: Localization and characterization by 125-I-gastrin binding studies and RT.PCR. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **358**: 278-92
- 36 Stepan VM, Krametter DF, Matsushima M, Todisco A, Delvalle J, Dickinson CJ. (1999) Glycine-extended gastrin regulates HEK cell growth. *Amer J. Physiol.* **277**: R572-R581

- 37 von Schrenck T, Ahrens M, de Weerth et al. (2000) CCKB/gastrin receptors mediate changes in sodium and potassium absorption in the isolated perfused rat kidney. *Kidney Int.* 58: 995-1003
- 38 Gekle M, Wünsch S, Oberleithner H, Silbernagl S. (1994) Characterization of two MDCKcell subtypes as a model system to study principal cell and intercalated cell properties. *European J Physiol.* **428**: 157-162
- 39 Hamm LI, Alpern RJ. (1992) Cellular mechanism of renal tubular acidification. In: Seldin DW, Giebisch G (eds)The kidney: physiology and pathophysiology, 2<sup>nd</sup> edn. Raven, New York, pp 2581-2626
- 40 Kersting U, Wojnowski L, Steigner W, Oberleithner H. (1991) Hypotonic stress-induced release of KHCO<sub>3</sub> in fused renal epitheloid (MDCK) cells. *Kidney Int.* **39**: 891-900
- 41 Drenckhahn D, Schluter K, Allen DP, Bennett V. (1985) Colocalization of band 3 with ankyrin and spectrin at the basal membrane of intercalated cells in the rat kidney. *Science*. **230**: 1287-1289
- 42 Van Adelsberg JS, Edwards JC, Al-Awqati Q. (1993) The apical Cl<sup>-</sup>/HC0<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger of ßintercalated cells. *J Biol Chem.* **268**: 11286-11289
- 43 Christophe J. (1994). Pancreatic tumoral cell line AR4-2J: an an amphicrine model. *Am J Physiol.* **266** (*Gastrointest Liver Physiol.* **29**): G963-G971
- 44 del Valle J, Tsunoda Y, Williams JA, Yamada T. (1992) Regulation of  $(Ca^{2^+})_i$  by secretagogue stimulation of canine gastric parietal cells. *Am J Physiol.* **262** (*Gastrointest Liver Physiol* **25**): G420-G426
- 45 del Valle J, Lucey MR, Yamada T. (1995) Gastric secretion. In: *Textbook of Gastroenterology* (2<sup>nd</sup> ed.), edited by T. Yamada. Philadelphia, PA: Lippincott, p. 295-326
- 46 Todisco A, Takeuchi Y, Yamada J, Urumov A, Stepan V, Yamada T. (1997) Molecular mechanisms for the growth factor action of gastrin. Am J Physiol.273 (Gastrointest Liver Physiol 36): G891-G898
- 47 Stepan VM, Dickinson CJ, del Valle J, Matsushima M, Todisco A. (1999) Cell type-specific requirement of the MAPK pathway for the growth factor action of gastrin. *American Physiological Society*. **99**: G1363-G1371
- 48 Höcker R, Henihan RJ, Rosewicz S, Riecken EO, Zhang Z et al. (1997) Gastrin and phorbol 12-myristate 13-acetate regulate the human histidine decarboxylase promoter through Raf-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase-related signaling pathways in gastric cancer cells. *J Biol Chem* **272**: 27015-27024
- 49 Cobb MH, Goldsmith EJ. (1995) How MAP kinases are regulated. J Biol Chem. 270: 14843-14846
- 50 Davis JR. (1993) The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem.* **268**: 14553-14556
- 51 Treisman R. (1995) Journey to the surface of the cell: *fos* regulation and the SRE. *EMBO J* **14**: 4905-4913
- 52 Savasta M, Palacios JM, Mengod G. (1988) Regional localization of the mRNA coding for the neuropeptide cholecystokinin in the rat brain studied by in situ hybridization. *Neurosci Lett* **93**: 132-8
- 53 Rehfeld JF, van Solinge WW. (1994) The tumor biology of gastrin and cholecystokinin. *Adv Cancer Res.* **63**: 295- 347

- 54 Smith JP, Solomon TE. (1998) Effects of gastrin, proglumide, and somatostatine on growth of human colon cancer. *Gastroenterology*. **95**: 1541-1548
- 55 Reubi JC, Macke HR, Krenning EP. (2005) Candidates for peptide receptor radiotherapy today and in the future. *J Nucl Med* **46**: 67S-75S
- 56 Weiner RE, Thakur ML. Radiolabeled peptides in oncology: role in diagnosis and treatment. (2005) *BioDrugs* **19(3)**: 145-63
- 57 Reubi JC, Wenger S, Schmuckli-Maurer J, Schaer JC, Gugger M. (2002) Bombesin Receptor Subtypes in Human Cancers: Detection with the Universal Radioligand 125I-(D-TYR6, β-ALA11, PHE13, NLE14)Bombesin(6-14) Clinical Cancer Research 8: 1139-1146
- 58 Heuser M, Schlott T, Schally AV, Kahler E, Schliephake R, Laabs SO, Hemmerlein B. (2005) Expression of gastrin releasing peptide receptor in renal cell carcinomas: a potential fuction for the regulation of neoangiogenesis and microvascular perfusion. *Journal of Urology* **173**: 2154-2159
- 59 Nock BA, Maina T, Behe M, Nikolopoulou A, Gotthardt M, Schmitt JS, Behr TM, Macke HR. (2005) CCK-2/gastrin receptor-targeted tumor imaging with (99)Tc-labeled minigastrin analogs. J Nucl Med. 46(10): 1727-36
- 60 Stepan VM, Tatewaki M, Matsushima M, Dickinson CJ, del Valle J, Todisco A. (1999) Gastrin induces c-fos gene transcription via multiple signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointes Liver Physiol* **276**: G415-G424
- 61 Treisman R. (1996) Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**: 205-15
- 62 Tsutsui S, Shinomura Y, Higashiyama S, Higashimoto Y, Miyazaki Y, Kanayama S, Hiraoka S, Minami T, KitamuraS, Murayama Y, Miyagawa J, Taniguchi N, Matsuzawa Y. (1997) Induction of Heparin Binding Epidermal Growth Factor and Amphiregulin mRNAs by Gastrin in the Rat Stomach. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **235**: 520-523
- 63 Pierce KL, Luttrell L, Lefkowitz RL. (2001) New mechanism in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. *Oncogene* **20**. 1532-1539
- 63 Unwin RJ, Ganz MD, Sterzel RB. Brain-gut peptides, renal function and cell growth. (1990) *Kidney Int* **37**: 1031-1047
- 64 Owyang C, Miller LJ, DiMagno EP, Brennan LA Jr, Go VL. (1979) Gastrointestinal hormone profile in renal insufficiency. *Mayo Clin Proc* **54(12)**: 769-73
- 65 Ravelli AM. (1995) Gastrointestinal function in chronic renal failure. *Pediatr Nephrol* **9(6)**: 756-62
- 66 Molina R, Auge JM, Alicarte J, Filella X, Vinolas N, Ballesta AM. (2004) Pro-gastrinreleasing peptide in patients with benign and malignant deseases. *Tumour Biol.* **25(1-2)**: 56-61

## 8. Danksagung

Ich danke PD Dr. Michael Bläker, Prof. Dr. Andreas de Weerth und Prof. Dr. Tammo von Schrenck für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Überlassung des Themas.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Michael Bläker für die exzellente und enge Betreuung während der Doktorarbeit. Über die wöchentlichen, intensiven Laborbespechungen unserer Arbeitsgruppe hinaus konnte man ihn jederzeit ansprechen, um neue Ergebnisse oder neu aufgetretene Probleme zu diskutieren. Durch seine herzliche und humorvolle Art hat die Zusammenarbeit aussergewöhnlich viel Spaß gemacht.

Die experimentelle Arbeit im Labor hat mir sehr viel Freude bereitet und viele wertvolle Erfahrungen gebracht. Ich danke allen Mitarbeitern und insbesondere Martina Schulz für ihre hervorragende Einarbeitung sowie sehr gute wissenschaftliche und liebevolle moralische Unterstützung während der Laborzeit.

## Ausserdem danke ich

Meiner Freundin Philomena für die unzählbaren, unvergesslichen und sehr lustigen Stunden rund um die Zellkultur Meinem Mann Stefan, dass er so weitsichtig war, am Nikolausabend 2001 nochmal ins Labor zu gehen

# <u>9. Lebenslauf</u>

Name:	Hanna Michaelis	
Geburtsdatum:	21.02.1979	
Geburtsort:	Hamburg	
Familienstand:	verheiratet Ehemann: Dr. Stefan Michaelis, Arzt	
Kinder:	Finn Michaelis, geboren am 25.07.2005	
Schule:		
1985-1989 1989-1998 26.06.1998	Grundschule An den Teichwiesen, Hamburg Walddörfer Gymnasium, Hamburg Abitur	
Studium:		
Oktober 1998-Mai 2005 September 2000 März 2002 März 2004 Mai 2005 Mai 2005	Medizinstudium an der Universität Hamburg Ärztliche Vorprüfung Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Approbation als Ärztin	
Dissertation:		
Januar 2001-Januar 2003	Labor Molekulare Gastroenterologie (Leitung: Prof. de Weerth), I. Medizinische Klinik, UKE, Hamburg	
Ärztliche Tätigkeit:		
Seit September 2006	I. Medizinische Abteilung, Asklepios Klinik Altona	

## <u>10. Erklärung</u>

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht an einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.