

Aus dem Institut für Pathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Helmut Erich Gabbert

**Bedeutung der Proteinkinase C für die
Adhäsion von Tumorzellen an verschiedene Substrate
der extrazellulären Matrix und an Endothelzellen –
eine *in vitro* Untersuchung am Beispiel humaner
Nierenkarzinom- und epitheloider Sarkomzelllinien**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Saida Zoubaa
2004

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Dekan

Referent: PD Dr. med. R. Engers

Korreferent: Prof. Dr. med. T. A. Vögeli

Inhaltsverzeichnis

1 Abkürzungsverzeichnis

2 Einleitung

- 2.1 Metastasierungskaskade und Tumorzelladhäsion
- 2.2 Familie der Proteinkinase C-Isoenzyme
- 2.3 Das Nierenzellkarzinom
- 2.4 Das epitheloide Sarkom

3 Fragestellung

4 Material und Methoden

- 4.1 Zelllinien und Zellkultur
- 4.2 Zellzählung
- 4.3 Chemikalien und Komponenten der extrazellulären Matrix
- 4.4 Adhäsionsassays an Komponenten der extrazellulären Matrix
- 4.5 Endothelzellisolation
- 4.6 Endothelzellkultur
- 4.7 Fixation von Endothelzellen zu immunhistochemischen Untersuchungen
- 4.8 Adhäsionsassays an Endothelzellen

5 Ergebnisse

- 5.1 Effekte von Inhibitoren der Proteinkinase C auf das Adhäsionsverhalten humaner Nierenkarzinomzelllinien an verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix
- 5.2 Effekte von Inhibitoren der Proteinkinase C auf das Adhäsionsverhalten humaner epitheloider Sarkomzelllinien an verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix
- 5.3 Adhäsion stabil transfizierter R6-Zellen an verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix
- 5.4 Effekte von Inhibitoren der Proteinkinase C auf das Adhäsionsverhalten humaner Nierenkarzinomzelllinien an humane Endothelzellen
- 5.5 Effekte von Inhibitoren der Proteinkinase C auf das Adhäsionsverhalten humaner epitheloider Sarkomzelllinien an humane Endothelzellen

6 Diskussion

- 6.1 Effekte der PKC-Inhibitoren auf die Adhäsion humaner Nierenkarzinomzelllinien an verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix
- 6.2 Effekte der PKC-Inhibitoren auf die Adhäsion humaner epitheloider Sarkomzelllinien an verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix
- 6.3 Effekte der PKC-Inhibitoren auf die Adhäsion humaner Nierenkarzinomzelllinien und epitheloider Sarkomzelllinien an humane Endothelzellen
- 6.4 Adhäsion stabil transfizierter R6-Fibroblasten an extrazelluläre Matrixkomponenten

7 Zusammenfassung

8 Literaturverzeichnis

9 Danksagung

A Anhang

- A.1 Lebenslauf
- A.2 Zusammenfassung

1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen der Aminosäuren

A; (Ala)	Alanin
C; (Cys)	Cystein
D; (Asp)	Aspartat
E; (Glu)	Glutamat
F; (Phe)	Phenylalanin
G; (Gly)	Glycin
H; (His)	Histidin
I; (Ile)	Isoleucin
K; (Lys)	Lysin
L; (Leu)	Leucin
M; (Met)	Methionin
N; (Asn)	Asparagin
P; (Pro)	Prolin
Q; (Gln)	Glutamin
R; (Arg)	Arginin
S; (Ser)	Serin
T; (Thr)	Threonin
V; (Val)	Valin
W; (Trp)	Tryptophan
Y; (Tyr)	Tyrosin
DAG	Diacylglycerol
DMEM	„Dulbecco´s modified eagle medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	„Epidermal growth factor“
ECGS	„Endothelial cell growth factor“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	„Focal adhesion kinase“
FFA	„free fatty acid“
FGF	„Fibroblast growth factor“
GTPase	Guanosin-Triphosphatase
HUVEC	„Human umbilical vein endothelial cell“
H7	1-(5-Isoquinolinylsulfonyl)-2-Methylpiperazin
ICAM-1	„Intercellular adhesion molecule-1“

IAP	„Integrin-associated protein“ (Integrin-assoziiertes Protein)
IC ₅₀	Die Konzentration einer Substanz, bei der die Aktivität eines inhibierten Enzyms oder die Anzahl der in ihrer Proliferation inhibierten Zellen auf 50% reduziert ist
ILK	„Integrin-linked kinase“
IL-2	Interleukin 2
IP ₃	Inositoltrisphosphat
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MARCKS	„myristoylated alanine-rich C kinase substrate“
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid
PBS	„phosphate buffer saline“
PDGF	„Platelet derived growth factor“
PDK-1	Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1
PI	Phosphatidylinositol
PI-3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI-4-Kinase	Phosphatidylinositol-4-Kinase
PI(4)P	Phosphatidylinositol (4)-Phosphat
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphat
PI(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphat
PIP-Kinase	Phosphatidylinositolphosphokinase
PIP-5K	Phosphatidylinositolphospho-5-kinase
PKC	Proteinkinase C
PKM	Proteinkinase M (katalytisches Fragment der PKC)
PLB	Phospholipase B
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
RACK	„Receptor for activated C kinase „
RPTE	„renal proximal tubule epithelial cells“
TNF- α	„tumor necrosis factor α “

2 Einleitung

2.1 Metastasierungskaskade und Tumorzelladhäsion

Das biologische Verhalten eines malignen Tumors wird entscheidend durch die Fähigkeit der Tumorzellen zur Invasion und Metastasierung bestimmt. Hierbei handelt es sich um komplexe biologische Prozesse, bei denen sich Tumorzellen aus dem Gewebsverband herauslösen (Tumorzelldissoziation), in das Wirtsgewebe eindringen, anschließend in Blut- und Lymphgefäße einbrechen, in verschiedene Zielorgane verteilt und dort arretiert werden (Engers und Gabbert, 2000). Dem Tumorzellarrest folgen die Extravasation und Sekundärinvasion des Zielorganes. Aus den primär noch wenigen Tumorzellen im Zielorgan entwickelt sich nicht zwangsläufig eine klinisch manifeste Metastase. Häufig folgt eine Phase der Wachstumsretardierung („tumor dormancy“) mit der Option, unter bestimmten Bedingungen in eine aktive Proliferationsphase einzutreten und so zum Ausgangspunkt sogenannter Spätmetastasen zu werden (Engers und Gabbert, 2000).

Die Tumorzelldissoziation basiert auf der Fähigkeit der Tumorzellen zur aktiven Lokomotion bzw. Migration, welche wiederum vom Differenzierungsgrad eines Tumors bestimmt wird. So findet sich an der Invasionsfront vieler epithelialer Tumoren eine Differenzierungsblockade mit Verlust von E-Cadherin, einem transmembranären Glykoprotein und Zelladhäsionsmolekül, welche dazu führt, daß sich einzelne Tumorzellen aus dem Tumorverband herauslösen und in das Wirtsgewebe eindringen (Invasion). Die Invasion des Wirtsgewebes erfordert eine proteolytische Degradation der extrazellulären Matrix, die sich aus einer viskös-elastischen Grundsubstanz, Proteoglykanen, Glykoproteinen und den darin eingelagerten Faserproteinen, zusammensetzt (Engers und Gabbert, 2000). Unter der Migration (Lokomotion) versteht man die aktive Fortbewegung der Tumorzellen durch die enzymatisch eröffneten Gewebsstrukturen. Dieser Vorgang setzt eine gut koordinierte Interaktion zwischen Tumorzelle und extrazellulärer Matrix mit sequenziellem Ausbilden und Lösen adhesiver Kontakte voraus und wird im wesentlichen durch substratspezifische Integrine vermittelt (Ben-Zéev, 1997).

Nach dem Tumoreinbruch in das Blutgefäßsystem und der Verteilung der Tumorzellen mit dem Blutstrom spielt die Interaktion der Tumorzellen mit Endothelzellen und der sub-endothelialen extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle beim Verlassen der Gefäße (Extravasation) im Rahmen der hämatogenen Metastasierung. Die Tumorzellinteraktion mit der Gefäßwand besteht dabei aus mindestens vier Teilschritten:

1. der Adhäsion von Tumorzellen an das Endothel,
2. der Induktion einer Endothelzellretraktion durch Tumorzellen,
3. der Tumorzelladhäsion an die subendotheliale extrazelluläre Matrix und
4. der Invasion der subendothelialen Matrix.

Anschließend erfolgt die aktive Invasion der übrigen extrazellulären Matrix des Zielorgans, an der neben proteolytischen Prozessen wiederum Adhäsions- und Deadhäsionsvorgänge beteiligt sind (Liu et al., 1991; Engers und Gabbert, 2000).

Die extrazelluläre Matrix besteht aus Strukturproteinen und der dazwischen eingelagerten Grundsubstanz (Böcker et al., 2001). Zu den wesentlichen Strukturproteinen gehören verschiedene Kollagene und das Elastin. Kollagene lassen sich nach ihrer Verteilung in interstitielle und basalmembranassoziierte Typen gliedern. Sie werden in einer Vorläuferform als sogenannte Prokollagene synthetisiert und posttranslational durch Prozesse wie Hydroxylierungen und Glykosylierungen modifiziert. Durch proteolytische Abspaltung der amino- und carboxyterminalen Prokollagenpeptide entstehen die endgültigen Kollagenmoleküle. Ein wichtiger Vertreter der Kollagene ist das Kollagen IV. Es ist ein wesentlicher Bestandteil von Basalmembranen, die ihrerseits wiederum eine wichtige Rolle für die Verankerung epithelialer Zellen und damit für die Integrität epithelialer Gewebe spielen. Ein Abbau des Kollagens im Organismus erfolgt durch spezifische Kollagenasen, die teilweise auch von Tumorzellen produziert werden und somit bei der Regulation der Tumordinvasion eine wichtige Rolle spielen (Curran und Murray, 1999). Kollagene und elastische Fasern sind in eine amorphe Grundsubstanz eingelagert. Diese besteht aus Hyaluronsäure, Proteoglykanen, diversen Glykoproteinen, wie z. B. Fibronectin, Zellstoffwechselprodukten, Elektrolyten und Plasmaproteinen (Böcker et al., 2001). Die Komponenten der Grundsubstanz treten in Wechselwirkung mit Zellen und fibrillären Proteinen wie Elastin und Kollagen. Durch die Aggregation fibrillärer Proteine mit Hyaluronsäure, der Hauptkomponente der Grundsubstanz, kommt es zur Ausbildung größerer Komplexe (Böcker et al., 2001).

Ein wichtiger Vertreter der extrazellulären Glykoproteine ist das Fibronectin, ein dimeres Glykoprotein, das von Fibroblasten, Endothelzellen, Schwann-Zellen und Makrophagen gebildet wird. Das lösliche Plasmafibronectin findet sich im Blut, während die unlösliche Form, das zelluläre Fibronectin, Bestandteil der extrazellulären Matrix ist (Kosmehl et al., 1996). Über alternatives Splicing entstehen Varianten, die auch die Zelladhäsion und Migration mitbestimmen. An Zelloberflächen existieren spezifische Rezeptoren für Fibronectin, die zu den Integrinen gehören. Im Organismus haben Fibronectine wichtige biologische Funktionen (Böcker et al., 2001). Sie sind vor allem an der Regulation der Zellproliferation, Migration und der Differenzierung beteiligt (Kosmehl et al., 1996).

Laminin ist ein weiteres wesentliches Protein der extrazellulären Matrix. Laminin ist ein trimeres Glykoprotein und kommt ausschließlich in Basalmembranen vor. Es bindet an Proteoglykane, Typ IV-Kollagen und Zellmembranen (Böcker et al., 2001). Laminin besteht aus α -, β - und γ -Ketten mit einem Molekulargewicht von 140-400 kDa. Zellbiologisch führt Laminin zur Beeinflussung wichtiger Prozesse wie der Adhäsion, des Wachstums, der Migration, der Differenzierung sowie der Produktion der Kollagenase IV. Anders als Fibronectin spielt Laminin eher in den Spätstadien der Zelldifferenzierung eine Rolle (Kosmehl et al., 1996). Nach Kollagen IV ist Laminin quantitativ das zweitwichtigste Matrixprotein der Basalmembranen. Entaktin (Nidogen) bindet mit seinem COOH-terminalen Ende an Laminin, mit seinem NH₂-terminalen Ende an Kollagen IV und dient somit als Brückenmolekül zwischen Laminin und Typ IV-Kollagen. Zahlreiche Arbeiten untersuchten die Bedeutung von Laminin für die Zelladhäsion (Wewer et al., 1987, Blood und Zetter, 1993; Jenq et al., 1994; Sobel, 1993). So wiesen invasive Karzinome an der Invasionsfront in der Regel defekte Basalmembranen auf (Wewer et al., 1987; Flug et al., 1995; Lohi, 2001). In vitro fördert Laminin die Metastasierung und die Produktion von Kollagenase IV durch Tumorzellen, die wiederum zu einer enzymatischen Auflösung der peritumoralen Gewebsstrukturen führte (Liotta et al., 1987; Lohi, 2001).

Ein Großteil der zellulären Rezeptoren für Proteine der extrazellulären Matrix gehört zur Gruppe der Integrine. Dabei handelt es sich um transmembranöse Heterodimere, bestehend aus zwei nichtkovalent gebundenen α - und β -Ketten (Humphries, 2000). Die Mehrzahl der Integrine bindet an Komponenten der extrazellulären Matrix, andere wiederum, v. a. die β_2 -Integrine, binden an lösliche Liganden, wie z.B. Fibrinogen, oder an Rezeptoren benachbarter Zellen wie z.B. das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 (Clark und Brugge, 1995). Die Spezifität von Integrinen für bestimmte Substrate basiert auf zahlreichen Kombinationsmöglichkeiten zwischen verschiedenen α - und β -Ketten. Durch die Interaktion mit Komponenten der extrazellulären Matrix stellen Integrine eine Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix und Proteinen des intrazellulären Zytoskeletts her. Die Stärke dieser Interaktion kann im Rahmen des sog. „inside out signaling“ durch verschiedene intrazelluläre Signale beeinflusst werden, die auf diese Weise sowohl die Zell-Substratadhäsion als auch die Zellmigration regulieren (Kolanus und Seed, 1997).

2.2 Familie der Proteinkinase C-Isoenzyme

Obwohl der Interaktion von Tumorzellen mit der extrazellulären Matrix eine ganz wesentliche Bedeutung für den Invasions- und Metastasierungsprozeß zukommt, ist bislang nur

teilweise bekannt, welchen Regulationsmechanismen die in diese Interaktionen involvierten Moleküle unterliegen und wie sie in ihrer Funktion gezielt beeinflusst werden können. Viele Gründe sprechen dafür, daß hierbei insbesondere die Proteinkinase C (PKC) als ein Schlüsselenzym der intrazellulären Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielen könnte. So ist die PKC einerseits in die Signalkette verschiedener Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, PDGF, FGF) und Cytokine (z. B. TNF- α , IL-2) eingebunden, andererseits ist sie das entscheidende intrazelluläre Substrat für Phorbolster, die allgemein als Tumorpromotoren bekannt sind. Sowohl für Wachstumsfaktoren und Zytokine als auch für verschiedene Phorbolster wurde gezeigt, daß sie das Invasions- und Metastasierungsverhalten von Tumoren beeinflussen können (Gopalakrishna und Barsky, 1988; Takenaga und Takahashi, 1986; Lichtner et al., 1993; Chiang et al., 1996). Außerdem ist bekannt, daß die Aktivierung der PKC mit einer Translokation des Enzyms vom Zytoplasma zur Zellmembran einhergeht und dort über die Phosphorylierung von Zelloberflächenmolekülen/-rezeptoren wie Adhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktorrezeptoren zur quantitativen und/oder funktionellen Beeinflussung dieser Rezeptoren führt (Nishizuka, 1986; Freed et al., 1989; Parise et al. 1990; Kolanus und Seed, 1997). So läßt sich z. B. die E-Cadherin bzw. ICAM-1 oder ELAM-1 vermittelte Zelladhäsion durch Aktivierung der PKC steigern (Cowell et al., 1999; Shafer et al., 1999). Außerdem spielt die PKC eine wichtige Rolle bei der Regulation der Aktivität von Integrinen und der damit verbundenen Zell-Substratadhäsion (Rigot et al., 1998). So führen Zytokine und Wachstumsfaktoren über eine Aktivierung ihrer Rezeptoren zur Aktivierung der Phospholipasen B (PLB) oder C (PLC), die die Reaktion Phosphatidylbisphosphat \rightarrow Diacylglycerol + Inositol-Trisphosphat katalysieren (Abb.1). Diacylglycerol aktiviert die PKC auf direktem Weg, Inositol-Trisphosphat indirekt über die Mobilisierung intrazellulärer Kalziumspeicher. Die Integration der PKC in die Integrin-vermittelte Signaltransduktion ist in zahlreichen Studien untersucht worden. Dabei wird diskutiert, daß die PKC die Integrine *in vivo* über eine Phosphorylierung ihrer zytoplasmatischen Domänen beeinflusst (Kolanus und Seed, 1997; Rigot et al., 1998). Allerdings korreliert der Phosphorylierungszustand der Integrine nicht direkt mit der Aktivität der PKC (Hibbs et al., 1991; Valmu und Gahmsberg, 1995; Kolanus und Brian, 1997). Man vermutet daher, daß die PKC die Integrine im wesentlichen indirekt über intrazelluläre Vermittler beeinflusst (Kolanus und Seed, 1997), z.B. über das „Remodelling“ des Zytoskeletts (Timar et al., 1992; Flaishon et al., 2001; Zhou et al., 2001). Außerdem konnten einige Untersuchungen zeigen, daß sowohl die Invasion als auch die Metastasierung bestimmter Tumoren durch Inhibitoren der PKC gehemmt werden kann (Cowell and Garrod, 1999; Kiley et al., 1999; La Porta and Comolli, 2000; Park et al., 2000; Jansen et al, 2001). Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der Proteinkinase C in humanen Nierenzellkarzinomen und humanen epitheloiden Sarkomen wurden bislang jedoch

kaum bzw. gar nicht durchgeführt. Eine Arbeit von Hansen et al. (1993) zeigte, daß unter anderem die PKC in die Regulation der Aktivität des interzellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in Nierenzellkarzinomen involviert ist.

Interessanterweise handelt es sich bei der PKC nicht um ein einzelnes Enzym, sondern um eine Familie von mindestens 11 Isoenzymen (α , β I, β II, γ , δ , ϵ , η , θ , ζ , ι (λ) und μ). Auf molekularer Ebene bestehen diese Isoenzyme aus einer einzigen Polypeptidkette und werden auf der Grundlage ihrer Calcium-Abhängigkeit und ihrer Fähigkeit, Diacylglycerol (DAG) und Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) zu binden, in drei Subfamilien unterteilt. Die klassischen PKC-Isoenzyme (cPKC) PKC- α , - β I, - β II und - γ sind Calcium-abhängig und können durch Diacylglycerol und Phorbol-ester aktiviert werden. Die sogenannten neuen Isoenzyme (nPKC) PKC- δ , PKC- ϵ , PKC- η (L) und PKC- θ sind Calcium-unabhängig, lassen sich aber durch Phorbol-ester aktivieren. Im Gegensatz hierzu sind die atypischen PKCs (aPKC) PKC- ζ und - ι (λ) Calcium-unabhängig und können weder durch Diacylglycerol noch durch Phorbol-ester aktiviert werden. PKC- μ nimmt aufgrund seiner molekularen Struktur mit einer zusätzlichen Pleckstrin-homologen (PH-) Domäne eine gewisse Sonderstellung ein, wird aber auch den nPKCs zugeordnet (Dekker und Parker, 1994; Johannes et al., 1994; Ron et al, 1999).

Alle PKC-Isoenzyme besitzen eine carboxyterminale katalytische und eine aminoternale regulatorische Domäne (Abb. 2), (Dekker und Parker, 1994; Ron et al., 1999). Die primäre Proteinstruktur der PKC kann in konstante (C1-C4) und variable Abschnitte (V1-V5) unterteilt werden. Die katalytische Domäne besteht aus den C-terminalen Regionen C3-V5 und wird durch die V3-Region von der N-terminalen regulatorischen Domäne getrennt.

Die N-terminale V1-Region der cPKC-Isoenzyme ist relativ kurz und besteht aus nur 20 Aminosäuren, deren Funktion bislang nicht geklärt ist. Demgegenüber zeigen nPKC-Isoenzyme eine weitaus größere V1-Region, die wahrscheinlich die Funktion der konstanten Regionen moduliert (Dekker und Parker, 1994).

Zu Beginn der C1-Region findet sich eine Pseudosubstratstelle, die der Phosphorylierungsstelle bekannter PKC-Substrate ähnelt (Dekker und Parker, 1994). Im Unterschied zu diesen Substraten sind jedoch die entsprechenden Serin- und Threoninreste durch Alanin ersetzt, so daß eine Phosphorylierung nicht möglich ist. Indem diese Pseudosubstratstelle die katalytische Domäne, d.h. die Substratbindungsstelle, blockiert, übt sie eine autoregulatorische Funktion aus. Im inaktiven Zustand des Enzyms bindet sie an die Substratbindungsstelle der katalytischen Domäne. Die Aktivierung der PKC durch Lipide, DAG oder Calcium führt über eine Konformationsänderung des Proteins zur Dissoziation der Pseudosubstratstelle von der katalytischen Domäne, so daß diese anschließend mit spezifischen Substraten interagieren kann (Dekker und Parker, 1994).

Innerhalb der C1-Domäne findet sich außerdem eine zysteinreiche Region, die aus zwei Zinkfinger-Motiven mit jeweils 6 Zysteinresten besteht (Hofmann, 1997). Diese Region ist für die Bindung von Diacylglycerol und Phorbol ester von Bedeutung (Abb. 2). In der Gruppe der atypischen PKC-Isoenzyme, die durch Diacylglycerol und Phorbol ester nicht aktiviert werden können, fehlt eines der beiden Zinkfinger-Motive (Hofmann, 1997). Alle PKC-Isoenzyme, einschließlich der atypischen, weisen einen einheitlichen Abstand von 15 Aminosäuren zwischen Pseudosubstratstelle und Zinkfinger-Domäne auf. Die zysteinreiche Region zeigt Sequenzhomologien zu einer DNA-Bindungsdomäne verschiedener Proteine (Stabel et al., 1990). Daher liegt die Vermutung nahe, die PKC könne direkt an die DNA binden und somit über die Phosphorylierung bereits DNA-gebundener Proteine die Expression von Genen beeinflussen (Stabel et al., 1990).

Die C2-Region interagiert mit sauren Phospholipiden und enthält in den cPKC-Isoenzymen die Calcium-Bindungsdomäne. Da nPKC-Isoenzyme Calcium-unabhängig sind, wurde zunächst vermutet, daß sie keine C2-Region besitzen. Sequenzanalysen zeigten aber auf, daß die nPKC-Isoenzyme am N-terminalen Ende eine der C1-Domäne noch vorgeschaltete C2-ähnliche Domäne aufweisen (Sossin und Schwartz, 1993; Ochoa et al., 2001). Die V3-Region trennt die regulatorische von der katalytischen Domäne. Eine proteolytische Spaltung an dieser Stelle durch Trypsin oder Kalzium-abhängige Proteasen wie Calpain I und -II führt zu einer konstitutiven Aktivierung des Enzyms.

Die C3-Region enthält eine ATP-Bindungsstelle, die in den meisten Proteinkinasen, einschließlich der PKC, weitgehend konserviert ist. So unterscheiden sich die Isoenzyme PKC- α und - β lediglich um vier, PKC- ι und - ζ um zwei Aminosäuren (Hofmann, 1997). Eine Deletion der ATP-Bindungsstelle verhindert die Enzymaktivierung. Die meisten selektiven PKC-Inhibitoren hemmen kompetitiv die Bindung von ATP (Hofmann, 1997).

Die C4-Region der PKC enthält die Substratbindungsstelle und die Phosphattransfer-Region mit der auch in anderen Proteinkinasen bekannten Aminosäuresequenz DFG. Allein PKC- ι und - ζ zeigen mit der Substitution von F durch Y eine leichte Abweichung (Hofmann, 1997). Der D-Rest ist vermutlich für die Übertragung der Phosphatgruppe auf das Substrat verantwortlich. In nahezu allen PKC-Isoenzymen beträgt der Abstand zwischen ATP-Bindungsstelle und Phosphattransfer-Region 105-108 Aminosäuren (Hug, 1993). Eine Ausnahme bildet lediglich PKC- γ mit einem Abstand von 113 Aminosäuren (Hug, 1993).

Die vier klassischen PKC-Isoenzyme PKC- α , - β I, - β II und - γ , von denen PKC- β I und - β II durch alternatives Splicing auf RNA-Ebene entstehen und sich nur durch die carboxy-terminalen Region unterscheiden, zeigen untereinander eine hohe Sequenzhomologie. Sequenzunterschiede zwischen den Isotypen α , β und γ kommen in den variablen Regionen

V1-V5 vor, während die konstanten Regionen C1-C4 eine mindestens 95%ige Homologie aufweisen.

PKC- μ nimmt eine Intermediärstellung zwischen den Untergruppen der „neuen“ und der „atypischen“ PKCs ein. Einerseits ist der Besitz zweier konstanter zinkfingerähnlichen Domänen ein Charakteristikum der Gruppe der nPKC (Ron and Kazanietz, 1999). Andererseits findet man in PKC- μ eine atypisch lange Sequenz von 74 Aminosäuren zwischen den beiden Zinkfingerdomänen, eine ineffiziente Bindung von Phorbolestern und einen Verlust der Pseudosubstratstelle, was auf eine Zugehörigkeit der PKC- μ zu den atypischen PKCs hindeutet (Johannes et al., 1995). Diese strukturellen Merkmale führen zu der Annahme, daß sich die Regulation der Enzymaktivität der PKC- μ von derjenigen anderer Isoenzyme unterscheidet. So zeigte PKC- μ eine andere Sensitivität gegenüber bekannten PKC-Inhibitoren (Johannes et al., 1995). Die effektivste Hemmung wurde durch das Isoquinolin-Sulfonamid H89, einem kompetitiven ATP-Antagonisten, erzielt. Auch das Naphtalen-Sulfonamid H7 führte zur Hemmung von PKC- μ , während Staurosporin, ein potenter Inhibitor verschiedener anderer PKC-Isoenzyme, nur eine geringe Wirkung zeigte. Der Grund für die ineffiziente Phorbolsterbindung liegt wahrscheinlich in der räumlichen Struktur der zysteinreichen Regionen, die über 74 Aminosäuren getrennt sind (Johannes et al., 1995). Die ungewöhnliche Struktur der C1-Domäne in PKC- μ ist daher von funktioneller Bedeutung und wirkt sich auch auf die Sensitivität gegenüber Aktivatoren und Inhibitoren aus (Johannes et al., 1995; Hausser et al., 1999; Rennecke et al., 1999).

Im inaktiven Zustand ist die PKC primär im Zytoplasma lokalisiert (Basu, 1993; Ron and Kazanietz, 1999). Dabei interagiert die regulatorische Domäne über die Pseudosubstratstelle mit der katalytischen Domäne und verhindert somit die Substratbindung. Eine Aktivierung der PKC ist über zwei Wege möglich. Die Bindung allosterischer PKC-Aktivatoren oder Kofaktoren an die regulatorische Domäne induziert eine reversible Konformationsänderung, so daß die Substratbindungsstelle frei wird, und die Phosphorylierung anderer Proteine letztlich stattfinden kann. Die Aktivierung der PKC geht mit einer intrazellulären Translokation der Isoenzyme zur Plasmamembran oder zum Zellkern einher. Außerdem zeigen die verschiedenen Isoenzyme teilweise auch eine primär unterschiedliche subzelluläre Verteilung (z.B. Golgi-Apparat, endoplasmatisches Retikulum oder Mikrofilamente des Zytoskeletts) (Goodnight et al., 1995; Engers et al., 2000), wobei sich die jeweilige subzelluläre Lokalisation in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Zellen ändern kann (Kiley and Parker, 1995).

Eine zweite Möglichkeit, die PKC zu aktivieren, besteht in der Dissoziation der regulatorischen von der katalytischen Domäne über proteolytische Prozesse (Basu, 1993). Das katalytische Fragment, die sogenannte „Proteinkinase M“ (PKM), ist somit unabhängig von

Calcium und Phospholipiden. Die Proteolyse erfolgt, wie bereits oben erwähnt, über Proteasen, die durch Calcium aktiviert werden (Kishimoto et al., 1989). Eine prolongierte Assoziation des PKM-Fragments mit der Zellmembran führt allerdings zu einer fortschreitenden Proteolyse und letztlich zu einem Verlust der Aktivität, einer sogenannten „down-regulation“ (Rodriguez-Pena and Rozengurt, 1984).

In vivo erfolgt die Aktivierung der cPKC-Isoenzyme über eine Rezeptor-stimulierte und durch das Guanin-Nucleotid-bindende Protein (G-Protein) vermittelte Aktivierung der Phospholipase C (Abb.3). Die Phospholipase C hydrolysiert Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat zu Diacylglycerol und Inositoltrisphosphat. Letzteres mobilisiert Calcium aus intrazellulären Speichern, welches dann an die C2-Region der Proteinkinase C bindet und anschließend die Translokation des Enzyms an die Plasmamembran induziert. An der Plasmamembran erfolgt die Aktivierung der Proteinkinase C über die C1-Region durch Diacylglycerol und Phosphatidylserin (Hug und Sarre, 1993).

Im Gegensatz zu den cPKC-Isoenzymen ist die Aktivierung der nPKC-Isoenzyme Calcium-unabhängig. Sie erfordert allerdings wie bei den cPKC-Isoenzymen nach dem derzeit akzeptiertem Modell die Bindung von DAG oder Phorbolestern in Kombination mit einem Phospholipid als Kofaktor, wie z.B. Phosphatidylserin (Hug und Sarre, 1993; Ron and Kazanietz, 1999).

Eine weitere Möglichkeit der PKC-Aktivierung besteht durch andere Metabolite des Glycerolipid-Stoffwechsels. So kann z.B. Arachidonsäure PKC- α , PKC- β I und PKC- ϵ aktivieren und Phosphatidylinositol(4,5)-Bisphosphat DAG als Aktivator der PKC- α , PKC- β I und PKC- γ ersetzen. Darüber hinaus entsteht DAG nicht nur über die Metabolisierung von Inositol-Lipiden, sondern auch aus Phosphatidylcholin (Hug und Sarre, 1993). Somit ist davon auszugehen, daß zumindest ein Teil der PKC-Isoenzyme über unterschiedliche „second messengers“ aktiviert werden kann.

Die häufig in experimentellen Untersuchungen als Aktivatoren eingesetzten Phorbol ester übernehmen *in vitro* die Funktion von DAG (Hug und Sarre, 1993; Ron and Kazanietz, 1999). Im Gegensatz zu DAG sind sie jedoch intrazellulär stabil und führen somit nach temporärer Aktivierung der Proteinkinase C letztlich aber zu einer Enzymdegradation und Herunterregulation. Eine längere Exposition mit diesen Substanzen ist daher im experimentellen Ansatz problematisch.

Über die Aktivierung der aPKC-Isoenzyme ist noch wenig bekannt. PKC- ζ ist unabhängig von Kalzium, Phosphatidylserin und Diacylglycerol und wird stattdessen durch ungesättigte Fettsäuren, wie z.B. Arachidonsäure, sowie Produkte der Phosphatidylinositol-3'-Kinase aktiviert (Hug und Sarre, 1993). PKC- ι (λ) wird durch Phosphatidylserin und freie Fettsäuren (FFA: „free fatty acids“) aktiviert (Nishizuka, 1995).

Eine wichtige Rolle für die Aktivität der PKC spielt die Beeinflussung ihrer Phosphorylierung (Ron and Kazanietz, 1999; Gao et al, 2001). Die für alle PKC-Isoenzyme beschriebene Autophosphorylierung ist eine intramolekulare Reaktion an Serin- oder Threoninresten und abhängig vom PKC-Isotyp (Johannes et al., 1995). Initial erfolgt zunächst eine Transphosphorylierung durch vorgeschaltete, sog. „upstream“-Kinasen an Tyrosin- oder Serin/Threoninresten (Behn-Krappa und Newton, 1999; Ron und Kazanietz, 1999). Ein Enzym, das in diesem Zusammenhang häufig genannt wird, ist die Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1 (PKC-1), eine möglicherweise universelle PKC-Kinase, die *in vitro* sowohl cPKC- als auch nPKC- und aPKC-Isoenzyme phosphoryliert (Chou et al., 1998; Le Good et al., 1998; Ron and Kazanietz, 1999). Der Phosphorylierung durch die PDK-1 folgt eine Autophosphorylierung zweier konservierter Stellen am carboxyterminalen Ende der PKC-Sequenz (Keranen et al., 1995; Edwards et al., 1999; Behn-Krappa und Newton, 1999; Gao et al, 2001). Für jede dieser beiden Stellen hat die Autophosphorylierung eine unterschiedliche Bedeutung. Die Phosphorylierung der ersten Stelle (T-641) ist in PKC- β I, - β II und - δ für die Beeinflussung der katalytischen Aktivität der PKC-Isoenzyme verantwortlich, während die zweite Phosphorylierungsstelle (S-660) in PKC- β II die räumliche Faltung des Enzyms und die Bindung von Kalzium, ATP und Substraten reguliert (Zhang et al., 1994; Keranen et al., 1995; Edwards et al., 1999). Die Autophosphorylierung von PKC- β II reguliert darüber hinaus die Dissoziation des aktivierten Enzyms von der Plasmamembran (Feng et al., 1998). In PKC- α beeinflusst die Autophosphorylierung an der ersten Stelle die Aktivitätsdauer und Dephosphorylierungsrate des Enzyms, während durch die Autophosphorylierung der zweiten Stelle die Konformation des phosphorylierten Enzyms stabilisiert wird (Bornancin et al., 1996 und 1997). Die Phosphorylierung der PKC durch die PDK-1, gefolgt von der Autophosphorylierung, ist also im wesentlichen für die Enzymlokalisierung und -konformation entscheidend (Ron and Kazanietz, 1999; Gao et al., 2001). Die Bedeutung der Phosphorylierung von Tyrosinresten, wie bei PKC- δ , wird derzeit noch kontrovers diskutiert (Ron and Kazanietz, 1999). PKC- μ zeigt als einziges PKC-Isoenzym auch in der Abwesenheit von Cofaktoren eine ausschließlich die Serinreste betreffende, basale Autophosphorylierungsrate. Diese konstitutive Enzymaktivität würde erklären, weshalb eine Pseudosubstratstelle in PKC- μ nicht erforderlich ist. Vermutlich wird die basale Aktivität dieses Isoenzym durch eine permanente Assoziation mit der Zellmembran verursacht. Die aminoterminal hydrophobe Domäne fungiert dabei möglicherweise als ein integraler Membrananker. Die Membranlokalisierung sichert die unmittelbare Nachbarschaft und die permanente Verfügbarkeit eines wichtigen Regulators der PKC-Aktivität, Phosphatidylserin. *In vitro*-Untersuchungen konnten zeigen, daß Phosphatidylserin in der Lage ist, PKC- μ zu aktivieren und somit die basale Enzymaktivitätsrate zu beeinflussen (Johannes et al., 1995).

Neben den beschriebenen Unterschieden im strukturellen Aufbau und der Aktivierbarkeit der PKC-Isoenzyme existieren auch Unterschiede in der Substratspezifität. So sind z. B. Histone III, das Myelin-basische Protein und Protamin gute Substrate für die cPKC-Isoenzyme, während sie aber durch nPKC-Isoenzyme nur wenig phosphoryliert werden (Hug und Sarre, 1993). Die *in vivo* beobachtete selektive Phosphorylierung von Substraten durch bestimmte PKC-Isoenzyme basiert wahrscheinlich auf einer unterschiedlichen subzellulären Verteilung der Isoenzyme und einer damit verbundenen, lokal begrenzten Auswahl an Substraten (Goodnight et al., 1995; Jaken, 1996). Verantwortlich für diese unterschiedliche Verteilung der PKC-Isoenzyme sind PKC-bindende Proteine, zu denen u. a. die Zytoskelettproteine Vinculin und Talin, die sog. MARCKs-Proteine („myristoylated alanine-rich C kinase substrate“), das „MARCKs-related protein“, α - und γ -Adducin sowie die Annexine I und II gehören (Dong et al., 1995; Jaken, 1996).

Weiterhin unterscheiden sich die PKC-Isoenzyme auch hinsichtlich ihrer Verteilung im Gewebe und in verschiedenen Zelltypen, was auf isoenzymspezifische Funktionen hindeutet. PKC- α , - β /II, - δ , - ϵ und - ζ werden ubiquitär exprimiert, wohingegen die Expression von PKC- γ nahezu ausschließlich auf neurales Gewebe beschränkt ist (Hug, 1993; Engers et al., 2000). Mattila et al. zeigte 1994, daß Endothelzellen (HUVEC, „human umbilical vein endothelial cells“) neben den klassischen PKC-Isoenzymen PKC- α und PKC- β auch PKC- ϵ und PKC- ζ exprimieren. In der Niere konnten PKC- α , - δ , - ϵ , - ζ und - μ detektiert werden (Hug, 1993; Engers et al., 2000).

Hinsichtlich der Funktion gibt es mehrere Hinweise dafür, daß die PKC eine wichtige Rolle im Rahmen der Tumorgenese sowie der Regulation von Invasion und Metastasierung spielen könnte. Dabei scheinen die zellbiologischen Effekte der PKC allerdings eher tumor- oder sogar zelllinienspezifisch als allgemeingültig zu sein. Beim Vergleich von Tumor- und Normalgewebe fanden sich in Mammakarzinomen zum Beispiel deutlich höhere PKC-Aktivitätsspiegel als im normalen Brustdrüsengewebe (O'Brian et al., 1989; Carey et al., 1999) und in Schilddrüsenkarzinomen eine Punktmutation von PKC- α (Prevostel et al., 1995). Rhabdomyosarkome isogener Ratten zeigten im Vergleich zu Normalgewebe ebenfalls eine stärkere PKC- β -Expression, während die Expression von PKC- α und - ϵ reduziert war (Hanania et al., 1992). In anaplastischen Astrozytomen des Kindesalters, Gliosarkomen und Glioblastomen fand sich hingegen eine Überexpression von PKC- ϵ (Sharif et al., 1999). Transfektionsversuche zeigten, daß die Überexpression eines bestimmten PKC-Isoenzyms in Abhängigkeit von den jeweils verwendeten Zelllinien zu gegensätzlichen zellbiologischen Effekten führen kann (Borner et al., 1995; Goldstein, 1995). So führte die Expression von PKC- α in verschiedenen Mammakarzinomzelllinien teils zu einem weniger aggressiven, teils

zu einem aggressiveren Phänotyp (Manni et al., 1996; Ways et al., 1995). PKC-βI führte zur onkogenen Transformation von R6-Fibroblasten (Borner et al., 1995) und zur Steigerung der Proliferation von HD3-Kolonkarzinomzellen (Sauma et al., 1996; Khuri et al., 1996). In HT29-Kolonkarzinomzellen hingegen führte eine erhöhte Expression von PKC-βI zur Wachstumshemmung und Tumorsuppression (Choi et al., 1990; Goldstein et al., 1995). In der Ratte führte die Überexpression von PKC-ε zur malignen Transformation von Epithelzellen des Kolons und von R6-Fibroblasten (Perletti et al., 1998; Cacace et al., 1998). In humanen Neuroblastom-Zelllinien hingegen ist PKC-ε wahrscheinlich in die durch verschiedene Wachstumsfaktoren induzierte Zelldifferenzierung involviert (Fagerstrom et al., 1996). In NIH-3T3-Zellen führte die Überexpression von PKC-δ zur Hemmung des Zellwachstums (Mischak et al., 1993), während in Mammakarzinomzelllinien ein Anstieg des „anchorage-independent“-Wachstums induziert wurde (Kiley et al., 1999). Diese Ergebnisse machen deutlich, daß der Proteinkinase C bei der Entstehung und Regulation des biologischen Verhaltens maligner Tumoren zwar grundsätzlich eine wichtige Rolle zukommen könnte, Isoenzym-spezifische zellbiologische Funktionen jedoch eher tumorspezifisch sind und damit nicht uneingeschränkt von einem Tumorsystem auf das andere übertragen werden können.

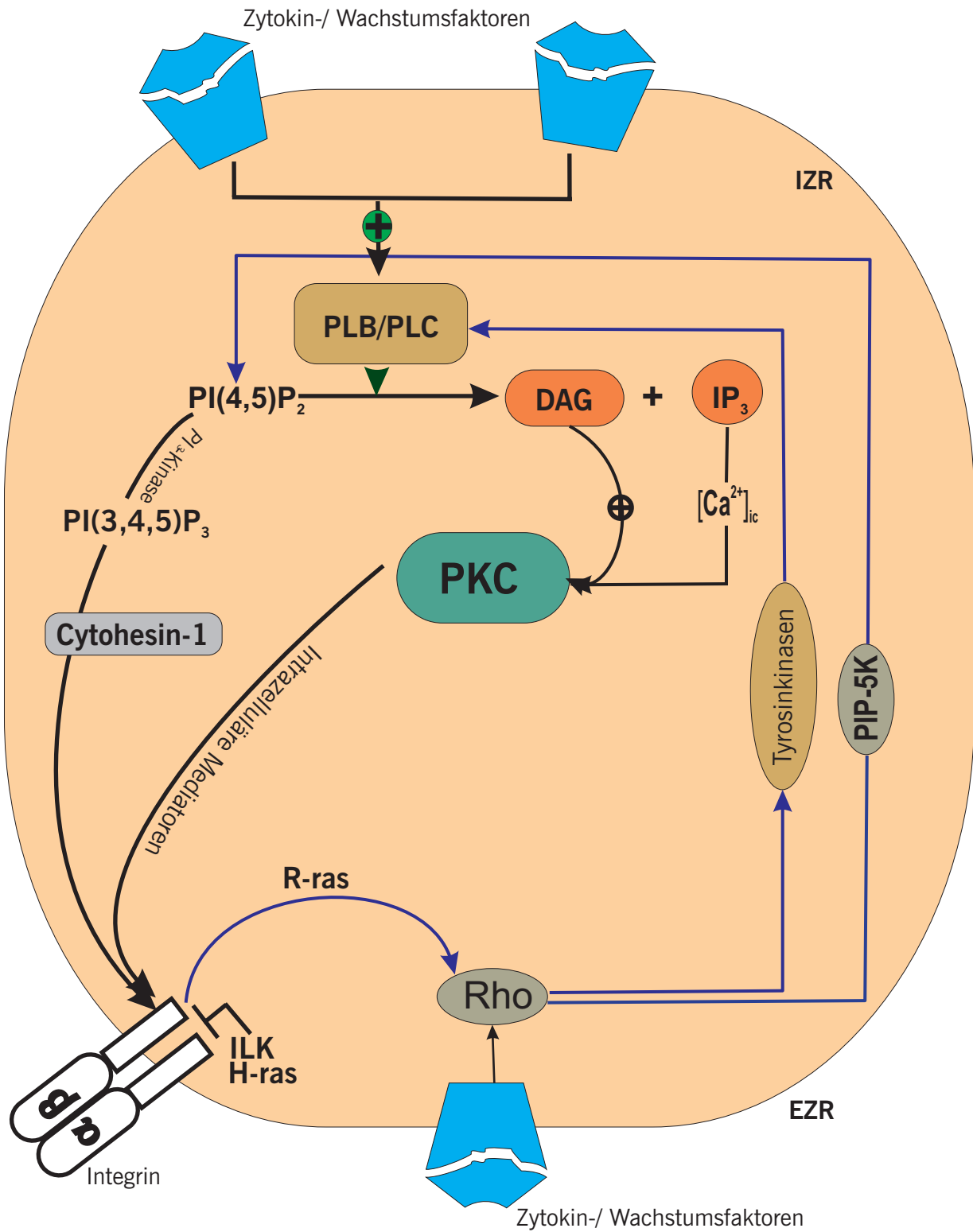
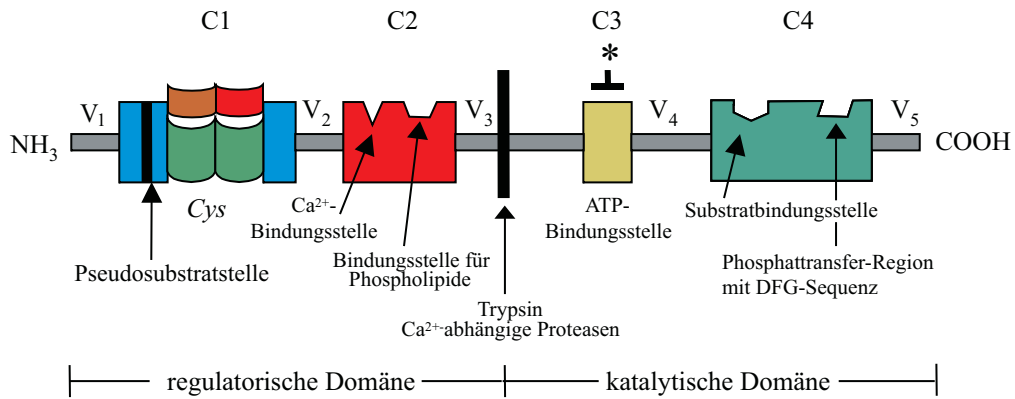
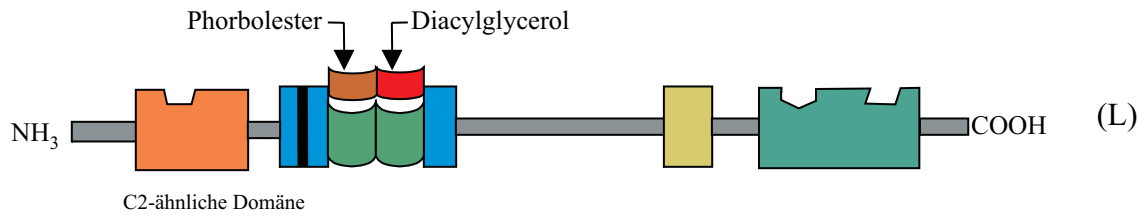


Abb.1. Die Proteinkinase C vernetzt Signale der Integrine mit denjenigen, welche über die Rezeptoren für Zytokine und Wachstumsfaktoren vermittelt werden. Die blauen Pfeile markieren die Aktivierungswege der Proteinkinase C durch Integrine. DAG: Diacylglycerol; EZR: Extrazellulärraum; IZR: Intrazellulärraum; ILK: „integrin-linked kinase“, assoziiert mit der zytoplasmatischen Domäne der β_1 -Integrine; IP₃: Inositol-trisphosphat; PI₃-Kinase: Phosphatidylinositol-3-Kinase; PIP-5K: Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase; PI(4,5)P₂: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat; PI(3,4,5)P₃: Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat; PKC: Proteinkinase C.

cPKC



nPKC



aPKC



PKC-μ

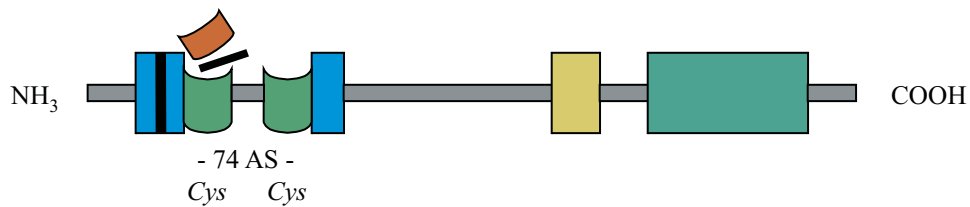


Abb.2. Strukturelle Charakteristika der PKC-Isoenzyme. C: konstante Region; Cys: Zystein-reiche Region; V: variable Region; 74 AS: der Abstand von 74 Aminosäuren zwischen den beiden Zinkfingerdomänen von PKC-μ verhindert die Bindung der Phorbol ester; *: Angriffspunkt der PKC-Inhibitoren Staurosporin, H7, GF 109203X und CGP 41251.

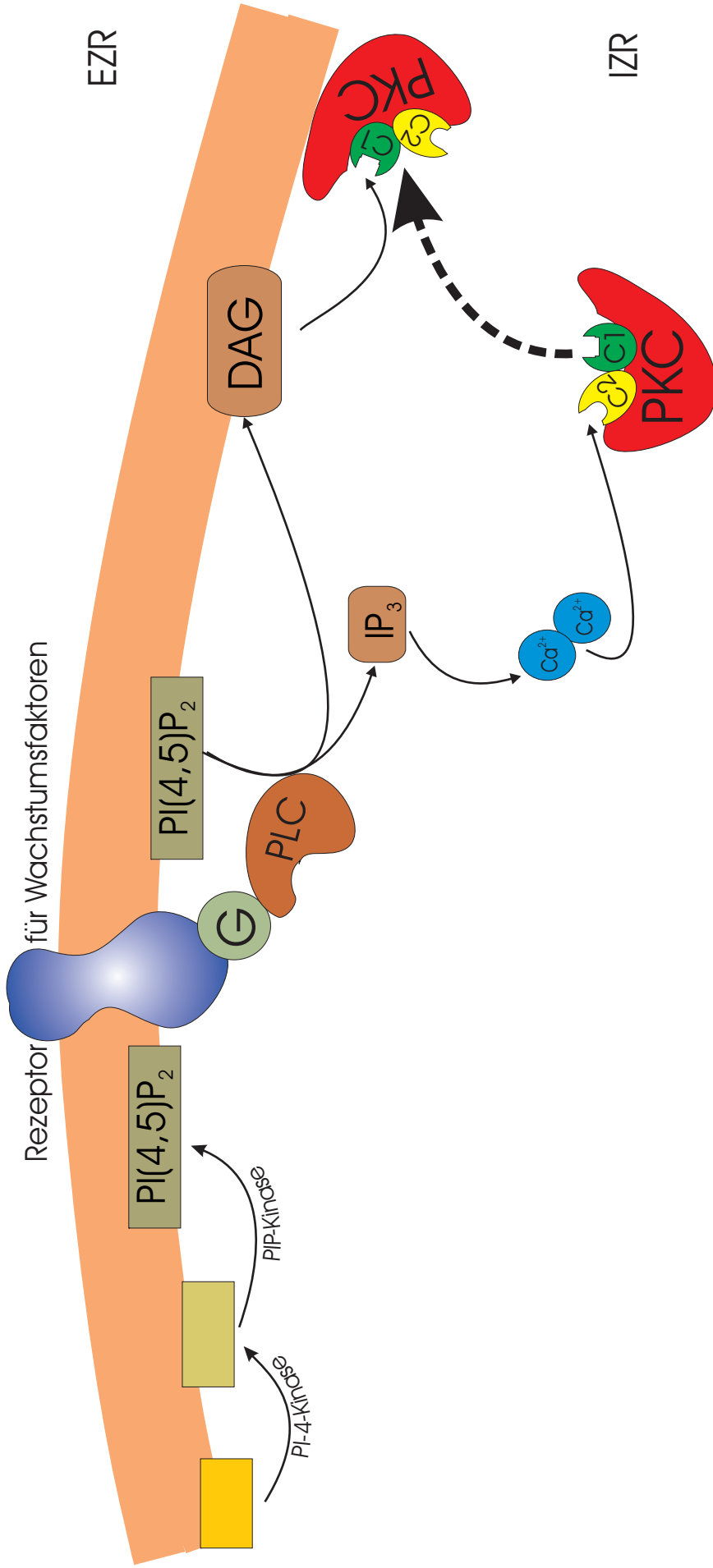


Abb. 3. Aktivierung der klassischen PKC-Isoenzyme. Das Vorläufer-Lipid Phosphatidylinositol(4,5)-Bisphosphat (PI(4,5)P₂) entsteht aus Phosphatidylinositol (PI) über Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PI(4)P). Die Phosphatidylinositol-Phospholipase C, die durch Stimulatoren, wie das G-Protein, aktiviert werden kann, spaltet PI(4,5)P₂ in DAG und den Kalziummobilisator Inositoltrisphosphat (IP₃). Kalzium fördert als Cofaktor die Translokation der Proteinkinase C zur Zellmembran, wo die eigentliche Aktivierung durch DAG erfolgt. Phorbol ester übernehmen in vitro die Funktion von DAG (Parekh et al., 2000). EZR: Extrazellulärraum; IZR: Intrazellulärraum.

2.3 Das Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom ist der häufigste maligne Tumor der Niere und macht etwa 3% aller malignen Tumorerkrankungen aus (Murphy et al., 1994). In Deutschland rangiert das Nierenzellkarzinom in der Häufigkeitsliste maligner Tumoren auf Platz 10 bei den Männern und auf Platz 14 bei den Frauen. Männer sind mit einem Verhältnis von 1,6 : 1 häufiger als Frauen betroffen. Insgesamt erkranken etwa 8000 Personen pro Jahr neu, und 1994 waren 2,4% aller Krebstodesfälle auf ein Nierenzellkarzinom zurückzuführen (Statistisches Landesamt Saarland, 1994). Die altersbezogene Inzidenz steigt vom 35. Lebensjahr an und erreicht im sechsten Lebensjahrzehnt den Höhepunkt. Etwa 80% aller Nierenzellkarzinome finden sich zwischen dem 40.-69. Lebensjahr (Störkel, 1989; Petersen, 1992; Gettman et al., 2001). Neben den sporadischen Fällen sind auch familiäre Formen bekannt. So sind 38-55% der Hippel-Lindau-Syndrome mit Nierenzellkarzinomen assoziiert, 1/3 der betroffenen Patienten versterben am Tumorleiden (Murphy et al., 1994).

Die Prognose der Nierenzellkarzinome wird im wesentlichen durch das „Tumorstaging“ und „Grading“ bestimmt. Das „Staging“ erfolgt nach dem TNM-System des „American Joint Committee on Cancer (AJCC)“ und der „International Union Against Cancer (UICC)“ (Tab.1). Grundsätzlich besteht eine negative Korrelation zwischen der Tumorausdehnung zum Zeitpunkt der Diagnose und der Prognose der Patienten. So beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate im TNM-Stadium pT1 98%, im TNM-Stadium pT2 84% (Gettman et al., 2001). Bei einem Tumorwachstum über die Kapsel hinaus (pT3a) sinken die 5-Jahres-Überlebensraten auf 58%, bei einem Lymphknotenbefall auf weniger als 20%. Beim Nachweis von Fernmetastasen betragen die 5- bzw. 10-Jahresüberlebensraten 20% bzw. 0% (Geboers und Debruyne, 1992; Gettman et al., 2001).

Die Prognose der Patienten wird aber insbesondere auch durch den Differenzierungsgrad („Grading“) der Tumore bestimmt. Die verschiedenen Grading-Systeme orientieren sich im wesentlichen an der Kernatypie, der Kern-Plasma-Relation und der Morphologie des Nukleolus (Murphy et al., 1994, Goldstein et al., 1997). Derzeit wird insbesondere das Grading-System nach Fuhrman et al. (1982) verwendet (Goldstein et al., 1997).

Stadium	Definition
Primärtumor (T)	
TX	Der Primärtumor kann nicht eingeschätzt werden
T0	Kein Primärtumor nachweisbar
T1	Tumorgröße \leq 7cm, auf die Niere begrenzt
T2	Tumorgröße $>$ 7cm, auf die Niere begrenzt
T3	der Tumor infiltriert die großen Venen, die Nebenniere oder das perirenale Gewebe, überschreitet aber nicht die Gerota Faszie
T3a	Der Tumor infiltriert die Nebenniere oder das perirenale Gewebe, überschreitet aber nicht die Gerota Faszie
T3b	Der Tumor infiltriert die Vv. renales oder die V. cava inf. bis unter das Diaphragma
T3c	Der Tumor infiltriert die V. cava inf. über das Diaphragma hinaus
T4	Der Tumor überschreitet die Gerota-Faszie
Lymphknoten (N)	
NX	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in einem einzigen regionalen Lymphknoten
N2	Metastasen in mehr als einem regionalen Lymphknoten
Fernmetastasen (M)	
MX	Das Vorhandensein von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tab. 1. TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinoms (AJCC und UICC, 1997)

Neben der Tumorausdehnung und -differenzierung ist auch der histologische Subtyp für die Prognose des Nierenzellkarzinoms von Bedeutung. Histologisch werden die Nierenzellkarzinome wie folgt klassifiziert (Thoenes et al., 1986, Störkel et al., 1997):

1. das konventionelle oder klarzellige Nierenzellkarzinom
2. das papilläre (chromophilzellige) Nierenzellkarzinom
3. das chromophobzellige Nierenzellkarzinom
4. das Nierenzellkarzinom vom Sammelrohrtyp
5. das nicht klassifizierte Nierenzellkarzinom

Hinsichtlich des Wachstumsmusters unterscheidet man zwischen kompakten (trabekulären), tubulo-papillären und zystischen Formen. Nierenzellkarzinome des klarzelligen Typs sind mit einem Anteil von 70% die häufigsten Nierenzellkarzinome und zeigen überwiegend ein solides (trabekuläres) Wachstumsmuster (Murphy et al., 1994; Störkel, 1997). Sie sind im Vergleich zum chromophobzelligen Subtyp mit einer äußerst ungünstigen Prognose assoziiert. Nach Nephrektomie wegen eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms („low grade“), beträgt die Gesamtüberlebensrate nur etwa 50% (Murphy et al., 1994). Die Frage, ob und wie sich das papilläre Nierenzellkarzinom hinsichtlich seiner Prognose vom klarzelligen Subtyp unterscheidet, wird bisher kontrovers diskutiert. Eine kürzlich veröffentlichte retrospektive Studie ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Subtypen (Moch et al, 2000).

Allerdings erwies es sich als prognostisch relevant, das papilläre Nierenzellkarzinom histomorphologisch in zwei Untergruppen zu unterteilen: das basophile papilläre Nierenzellkarzinom (Typ 1) ist im Vergleich zum eosinophilen (Typ 2) mit einer bedeutend besseren Prognose assoziiert (Moch et al, 2000). Interessanterweise ist der Nachweis von Tumorgewebsnekrosen für das papilläre Nierenzellkarzinom im Gegensatz zum klarzelligen Subtyp prognostisch nicht von Bedeutung (Moch et al, 2000). Obwohl Multizentrität, Spätrezidive und Metastasen beim papillären Nierenzellkarzinom häufig sind, sind 80% dieser Tumoren bei Diagnosestellung auf die Niere beschränkt (Murphy et al., 1994). Etwa 94% der Patienten, bei denen eine radikale Nephrektomie wegen eines papillären Nierenzellkarzinoms im pT1-Stadium erfolgte, waren nach einem Beobachtungszeitraum von 10 Jahren rezidivfrei (Lau et al., 2002). Für Patienten mit einem chromophoben Nierenzellkarzinom betrug die 10-Jahres-Überlebensrate sogar 100% (Lau et al., 2002). Neben dem basophilen papillären zeigt daher das chromophobe Nierenzellkarzinom unter den histologischen Subtypen die günstigste Prognose (Moch et al, 2000). Der chromophobe Zelltyp ist in der Regel auf die Niere begrenzt und wird in den meisten Fällen als Grad II eingestuft. Das Nierenzellkarzinom vom Ductus-Bellini- bzw. Sammelrohrtyp macht weniger als 1% der Nierentumoren aus (Störkel et al., 1997). Dieser Subtyp wächst zwar relativ gut abgegrenzt und zeigt histologisch nur eine mäßige Anaplasie, verhält sich aber im Vergleich zu allen anderen Subtypen biologisch deutlich aggressiver (Moch et al, 2000). Über 50% der Patienten sterben an Metastasen (Murphy et al., 1994). In einer klinischen Studie der Universität von Kalifornien, die in einem Zeitraum von 1989-2000 955 Patienten umfaßte, betrug die mittlere Überlebenszeit 11,5 Monate (Chao et al, 2002). Sarkomatoide Veränderungen sind in allen bisher bekannten Subtypen des Nierenzellkarzinoms beobachtet worden und werden als Kriterium für eine Progression der jeweiligen Subtypen in sogenannte „high grade“-Tumoren gewertet (Störkel et al., 1997). Sie sind mit einer sehr ungünstigen Prognose assoziiert. Nierenzellkarzinome mit einer dominierenden sarkomatoiden Komponente sind hoch aggressiv und neigen zu Knochen- und Weichteilmetastasen im Bereich der Extremitäten. In einer klinischen Studie zwischen 1987 und 1998 betrug die mittlere Überlebensrate für betroffene Patienten nach einer Nephrektomie und systemischer Chemotherapie 8,5 Monate (Mian et al., 2002). Da es bisher keinen Anhalt dafür gibt, daß ein sarkomatoides Nierenzellkarzinom de novo entsteht, geht die UICC nicht von einem eigenständigen Subtyp, sondern von einer Entdifferenzierung oder Transformation der oben aufgeführten Subtypen aus (Störkel et al., 1997). Nierenzellkarzinome, deren eigentliche Histoarchitektur durch ein ausschließlich sarkomatoides Wachstum nicht mehr erkennbar ist, werden nach der UICC der Kategorie „nicht weiter klassifizierte Nierenzellkarzinome“ zugerechnet (Störkel et al., 1997). Der histomorphologische Aspekt eines Sarkoms bei diesen Tumoren kann zu Fehldiagnosen und folglich zu inadäquaten Therapiemaßnahmen führen.

Über die funktionelle Bedeutung der Proteinkinase C und ihrer Isoenzyme in humanen Nierenzellkarzinomen ist bislang nur wenig bekannt. Untersuchungen an primären Epithelzellen der proximalen Nierentubuli (RPTE: „renal proximal tubule epithelial cells“), von denen sich Nierenzellkarzinome des klarzelligen Typs histogenetisch ableiten, deuten jedoch darauf hin, daß die Proteinkinase C eine regulatorische Funktion für das biologische Verhalten humaner Nierenzellkarzinome besitzen könnte. In diesen Studien wurden primäre RPTE, E1A-immortalisierte und SV40-transformierte RPTE im Hinblick auf die Expression und Verteilung von PKC-Isoenzymen untersucht. Dabei exprimierten alle Zelllinien die PKC-Isoenzyme α , δ , ϵ und ζ , wobei für PKC- α eine gesteigerte basale Degradationsrate nur in proliferierenden und onkogen-veränderten Zellen beobachtet wurde (Dong, 1994).

2.4 Das epitheloide Sarkom

Das epitheloide Sarkom ist ein hochmaligner Weichgewebstumor noch unbekannter Histogenese, der sich vermutlich aus dem „primitiven Mesenchym“ entwickelt (Fisher, 1988; Weiss and Goldblum, 2001). Betroffen sind vorwiegend junge Erwachsene mit einem mittleren Lebensalter von 26 Jahren. Männer sind mit einem Verhältnis von 2:1 häufiger betroffen als Frauen. Die überwiegende Anzahl der Tumoren ist im Bereich der oberen und unteren Extremitäten lokalisiert. Mikroskopisch findet sich häufig ein von Nekrosen durchsetztes Tumorgewebe aus teils epitheloiden, teils spindelförmigen Zellen mit ausgeprägtem eosinophilem Zytoplasma (Mohr, 1997; Weiss and Goldblum, 2001). Der Tumor zeigt eine hohe Rezidivneigung, so daß ca. 77% der Patienten postoperativ, zum Teil aber auch erst nach mehr als 5 Jahren ein oder mehrere Rezidive entwickeln. Darüber hinaus entwickeln etwa 45% der Patienten Metastasen, die bevorzugt in der Lunge und den regionalen Lymphknoten auftreten. Die Prognose der Patienten mit epitheloidem Sarkom hängt insbesondere von der Größe und Tiefenausdehnung des Tumors, der Mitoserate sowie dem Nachweis von Blutungen, Nekrosen und einer Gefäßinvasion ab (Weiss and Goldblum, 2001). In einer Studie von Chase und Enzinger (1985) lag die Überlebensrate für Frauen bei 78%, für Männer bei 64%. Kann der Tumor nicht im Gesunden reseziert werden, ist die Prognose der betroffenen Patienten besonders schlecht, da sich Radio- und Chemotherapie als nur wenig effektiv erwiesen (Ross et al., 1997; Weiss and Goldblum, 2001). Über die Bedeutung der PKC für die Regulation des biologischen Verhaltens epitheloider Sarkome wurden bislang noch keine Untersuchungen durchgeführt.

3 Fragestellung

Wie unter 2.2 dargestellt, gibt es viele Hinweise darauf, daß die PKC eine wichtige Rolle spielen könnte bei der Regulation der für den Metastasierungsprozeß wichtigen Interaktionen von Tumorzellen mit ihrer zellulären und azellulären Umgebung. Da bislang noch sehr wenig bzw. nichts über die Bedeutung der PKC für das biologische Verhalten humaner Nierenzellkarzinome bzw. humaner epitheloider Sarkome bekannt ist, sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Fragen untersucht werden:

1. Läßt sich das Adhäsionsverhalten humaner Nierenkarzinomzelllinien an verschiedene Substrate der extrazellulären Matrix und Endothelzellen durch Inhibition der PKC beeinflussen?
2. Läßt sich das Adhäsionsverhalten humaner epitheloider Sarkomzelllinien an verschiedene Substrate der extrazellulären Matrix und Endothelzellen durch Inhibition der PKC beeinflussen?
3. Welche Bedeutung besitzen bestimmte PKC-Isoenzyme für die Regulation der Zelladhäsion an verschiedene Substrate der extrazellulären Matrix?

Um einen Vergleich mit anderen Publikationen zu ermöglichen, wurden neben den spezifischen PKC-Inhibitoren GF 109203X und CGP 41251 auch die weniger spezifischen Inhibitoren H7 und Staurosporin eingesetzt. Schließlich sollte die Bedeutung bestimmter PKC-Isoenzyme für das Adhäsionsverhalten am Beispiel stabil transfizierter R6-Fibroblasten definiert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Zelllinien und Zellkultur

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung der PKC für das Adhäsionsverhalten humaner Nierenzellkarzinome und humaner epitheloider Sarkome wurden folgende Zelllinien verwendet:

humane Nierenkarzinomzelllinien

clearCa- 3

clearCa- 5

clearCa-11

clearCa-12

clearCa-14

clearCa-19

clearCa-28

clearCa-39

humane epitheloide Sarkomzelllinien

Gruber-1A

Gruber-1B

Gruber-1C

Die humanen Nierenkarzinomzelllinien gehören alle zur Gruppe der klarzelligen Nierenzellkarzinome und wurden am Institut für Pathologie, wie von Gerharz et al. (1994) beschrieben, etabliert. Diese Zelllinien wurden ausgewählt, da sie sich zumindest teilweise hinsichtlich ihres Invasionsverhaltens *in vitro* und der Expression von PKC-Isoenzymen voneinander unterscheiden (Engers et al., 2000 und unveröffentlichte Ergebnisse, Tab. 2 und Tab. 3).

	PKC-α	PKC-ϵ	PKC-ζ	PKC-ι	PKC-μ
clearCa- 3	+	+	+	-	+
clearCa- 5	+	+	+	+	+
clearCa-11	+	-	+	-	-
clearCa-12	+	+	+	-	-
clearCa-14	+	+	+	+	+
clearCa-19	+	+	+	+	+
clearCa-28	+	+	+	+	+
clearCa-39	+	+	+	+	+

Tab. 2. PKC-Isoenzymexpressionsmuster der Nierenkarzinomzelllinien

Die Expressionsanalyse erfolgte mittels RT-PCR unter Verwendung Isoenzym-spezifischer Primer. PKC- β I, - β II, - γ , - δ , - η (L) und - θ wurden nicht exprimiert.

	PKC-α	PKC-ϵ	PKC-ζ	PKC-ι	PKC-μ
GRU-1A	+	+	+	+	+
GRU-1B	+	+	+	+	+
GRU-1C	+	+	+	+	+

Tab. 3. PKC-Isoenzymexpressionsmuster der epitheloiden Sarkomzelllinien

Die Expressionsanalyse erfolgte mittels RT-PCR unter Verwendung Isoenzym-spezifischer Primer. PKC- β I, - β II, - γ , - δ , - η (L) und - θ wurden nicht exprimiert.

Von allen bislang bekannten PKC-Isoenzymen werden in beiden Tumorentitäten lediglich die Isoenzyme PKC- α , - ϵ , - ζ , - ι , - μ exprimiert. Am Beispiel der humanen Nierenkarzinomzelllinien clearCa-5, -19, -28 und -39 konnte mittels Immunfluoreszenzuntersuchung eine Assoziation zwischen der Membranlokalisation von PKC- α und PKC- ϵ und dem Invasionsverhalten der Tumorzelllinien *in vitro* nachgewiesen werden (Engers et al., 2000). Interessanterweise ist PKC- δ , das von Epithelzellen des proximalen Nierentubulus (RPTE) der Ratte exprimiert wird, in keiner der Nierenkarzinomzelllinien nachweisbar (Engers et al., 2000).

Bei den Zelllinien GRU-1A, GRU-1B und GRU-1C handelt es sich um drei verschiedene klonale Subpopulationen, die sich alle von der humanen epitheloiden Sarkomzelllinie GRU-1 ableiten (Engers et al., 1994). Diese klonalen Subpopulationen unterscheiden sich sowohl morphologisch als auch zellbiologisch im Hinblick auf Wachstumsverhalten, Invasivität, Motilität, Adhäsionsverhalten an verschiedene Substrate der extrazellulären Matrix und die Sensitivität gegenüber Retinsäure und TNF- α (Engers et al., 1994, 1996 und 1999). Mittels RT-PCR und isoenzymspezifischer Oligonukleotidhybridisierung sowie im Western Blot konnte gezeigt werden, daß alle drei Zelllinien die PKC-Isoenzyme α , ϵ , ζ , ι und μ

exprimieren, während β I, β II, γ , δ , η (L) und θ nicht nachweisbar waren (Engers et al., unveröffentlichte Ergebnisse).

Die Kultivierung der verschiedenen Tumorzelllinien erfolgte in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), das von Sigma bezogen wurde. Penicillin-Streptomycin, L-Glutamin, Hepes und Arginin/ Asparagin wurden jeweils 1%ig und fetales Kälberserum (FCS) in einer Endkonzentration von 10% zugesetzt. Das Passagieren der Zelllinien erfolgte nach Ablösen der adhärennten Zellen mit einer 0.05%igen EDTA-Gebrauchslösung in PBS, wobei das EDTA als 1%ige Stammlösung, gelöst in PBS ohne Kalzium und Magnesium, von Versen bezogen wurde.

Um zu untersuchen, ob bestimmte PKC-Isoenzyme in die Regulation der Zell-Substrat-adhäsion involviert sind, sollten diese Isoenzyme in humanen Nierenkarzinomzellen stabil überexprimiert werden. Da dies trotz mehrerer Versuche und Methoden nicht gelang, wurde stattdessen das Adhäsionsverhalten stabil mit verschiedenen PKC-Isoenzymen transfizierter R6-Fibroblasten (Guadagno et al., 1992; Borner et al., 1995; Cacace et al., 1996 und 1998) analysiert. Die mit leerem Vektor, PKC- α , - ζ , - ϵ oder PKC- η transfizierten R6-Zellen wurden uns freundlicherweise von Dr. D. Fabbro (Basel, Schweiz), für diese Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Die erfolgreiche Transfektion dieser Zelllinien wurde im Western Blot verifiziert (Engers et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Die Kultivierung dieser Zellen erfolgte in DMEM low glucose (1000 mg/l) mit 10% FCS und 500 μ g/ml G 418 als Selektionsantibiotikum (Sigma).

4.2 Zellzählung

Um eine definierte Zellzahl einer Zelllinie auszusäen, wurde zunächst ein normaler Passagevorgang durchgeführt. Die Zellen wurden 10-15 min im Brutschrank bei 37 °C mit 0,05%igem EDTA inkubiert, um so den Zellrasen abzulösen. Anschließend wurden die Zellen in 5-10 ml Medium resuspendiert. Um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, wurde das Medium mehrmals über den Zellrasen gesprüht und in der Pipette auf- und abgezogen. Die Zellsuspension wurde steril in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und erneut mehrmals mit Hilfe einer Pipette auf- und abgezogen.

50 μ l dieser Zellsuspension wurden in ein „well“ einer 96er Loch-Zellkulturplatte pipettiert und 150 μ l Methylenblaulösung hinzugefügt. Die Auszählung der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Phasen-Kontrast-Mikroskops in einer Neubauer-Zählkammer, wobei nur vitale Zellen berücksichtigt wurden.

4.3 Chemikalien und Komponenten der extrazellulären Matrix

Als PKC-Inhibitoren wurden verwendet:

- 1) das Indolcarbazol Staurosporin,
- 2) das Aminoalkylbismalamid GF 109203X,
- 3) das Staurosporinderivat CGP 41251 und
- 4) H7 (1-(5-Isoquinolinylsulfonyl)-2-Methylpiperazin).

Alle nicht näher aufgeführten Reagenzien wurden von Sigma bezogen (Deisenhofen, Deutschland). Staurosporin, CGP 41251 und GF 109203X wurden in DMSO, H7 in DMEM gelöst und in den folgenden Stammkonzentrationen bei -20°C gelagert:

Staurosporin	0,2 mM
GF 109203X	50 mM
CGP 41251	10 mM
H7	500 μ M

Da DMSO bekanntermaßen lichtempfindlich ist, werden alle Versuche mit in DMSO gelösten PKC-Inhibitoren unter Lichtschutz durchgeführt. Für die Adhäsionsversuche wurden folgende Konzentrationen eingesetzt:

Staurosporin:	1 nM und 10 nM,
GF 109203X:	50 nM und 500 nM,
CGP 41251 :	0,5 nM und 5 nM,
H7	: 10 μ M und 100 μ M.

Diese Konzentrationen wurden ausgewählt, da in vorab durchgeführten Untersuchungen gezeigt worden war, daß sie noch keine toxischen Effekte auf die zu untersuchenden Zellen besitzen, während bei höheren Konzentrationen toxische Effekte auftraten (Engers et al., 2000). Die aufgeführten Konzentrationen liegen daher aber zum Teil unter den IC₅₀-Werten, die in der Literatur für die Hemmung verschiedener PKC-Isoenzyme angegeben werden (Tab. 4), so daß z. B. Staurosporin in den gewählten Konzentrationen zumindest einige PKC-Isoenzyme, wie PKC- δ , - ϵ , - μ und - ζ -im Gegensatz zu PKC- α , - γ und - η - nicht effektiv zu inhibieren vermag. Für CGP 41251 liegen die IC₅₀-Werte für die Hemmung der PKC- δ , - ϵ , - γ , - η und - ζ über der maximal verwendeten Konzentration von 5 nM. Ähnliches gilt für GF 109203X hinsichtlich PKC- μ und - ζ . Im Gegensatz hierzu hemmt GF 109203X effektiv PKC- α , - β , - δ , - ϵ und - γ . Allerdings variieren die in der Literatur angegebenen IC₅₀-Werte z. T. erheblich, was teilweise durch eine unterschiedliche Effektivität der Inhibitoren in Abhängigkeit von der subzellulären Lokalisation der PKC-Isoenzyme erklärt werden kann (Dumont et al., 1992; Budworth und Gescher, 1995; Hofmann, 1997). Angriffspunkt der Inhibitoren sind entweder die regulatorische oder katalytische Domäne der Proteinkinase C

(Toullec et al., 1991). In der vorliegenden Arbeit wurden die Inhibitoren H7, Staurosporin, GF 109203X und CGP 41251 verwendet, deren Wirkungsmechanismus auf einer Inhibition der katalytischen Domäne beruht. Während GF 109203X und CGP 41251 den PKC-spezifischen Inhibitoren zugerechnet werden, gehören H7 und Staurosporin zu den nicht-selektiven Kinase-Inhibitoren (Wilkinson et al., 1993; Siegrist et al., 1995). Staurosporin, ein aus mikrobiologischen Quellen (*Streptomyces staurosporens*) isoliertes Alkaloid, weist unter den bekannten PKC-Inhibitoren zwar den stärksten inhibitorischen Effekt auf, zeigt jedoch im Gegensatz zu CGP 41251 eine deutlich geringere PKC-Selektivität (Toullec et al., 1991; Budworth und Gescher, 1995; Hofmann et al., 1997). Das Isoquinolin H7 ($IC_{50} = 6 \mu M$) und Staurosporin ($IC_{50} = 3 nM$) binden an die ATP-Bindungsstelle. H7 weist *in vitro* und *in vivo* eine nur geringe Selektivität auf und inhibiert gleichermaßen die Proteinkinase C ($IC_{50} = 6 \mu M$) und die cAMP-abhängige Proteinkinase ($IC_{50} = 3 \mu M$) (Basu, 1993). Budworth zeigte 1995, daß H7 und Staurosporin in Mammakarzinomzellen, deren zytosolische Proteinkinase C vorwiegend aus PKC- ϵ und - ζ bestand, die membrangebundenen PKC-Fraktionen stärker als die zytosolischen inhibieren. Da H7 und Staurosporin trotz fehlender PKC-Spezifität in zahlreichen publizierten Untersuchungen als Inhibitoren der PKC verwendet wurden und ein Vergleich unserer Ergebnisse mit diesen Untersuchungen möglich sein sollte, wurden auch diese Inhibitoren in der vorliegenden Arbeit eingesetzt.

GF 109203X leitet sich biochemisch von Staurosporin ab, gehört zu den Aminoalkyl-bismalamiden und ist ein potenter und selektiver PKC-Inhibitor (IC_{50} -Wert in MCF-Zellen: $21 \pm 4 nM$) (Budworth und Gescher, 1995). Die Substanz ist ein kompetitiver Antagonist des ATP-Moleküls ($K_i = 14 \pm 3 nM$) und zeigt eine hohe Selektivität gegenüber der Proteinkinase C (Toullec et al., 1991; Budworth und Gescher, 1995). Darüber hinaus ist bekannt, daß GF 109203X die Aktivität aller klassischen PKC-Isoenzyme gleichermaßen hemmt (Toullec et al., 1991).

Der Vergleich zwischen Staurosporin und CGP 41251 (N-Benzoyl-Staurosporin) zeigt, daß die chemische Modifizierung des Staurosporins an der zweiten Aminogruppe eine geringfügige Reduktion der PKC-Hemmung, aber gleichzeitig eine höhere Selektivität zur Folge hat. So sind z.B. die IC_{50} -Werte von CGP 41251 für die cAMP-abhängige Proteinkinase um den Faktor 50 und für die S6-Kinase um den Faktor 100 größer als für die PKC (Meyer et al., 1989).

	H7	Staurosporin	CGP 41251	GF 109203X
PKC gesamt	80 (1)	0,008 (1)	0,05 (2)	0,01 (2) – 0,03 (3)
Zytosolische PKC (1)	54	0,0163	0,044	0,021
Membranständige PKC (1)	15	0,0013	0,61	0,021
PKC-α	n.u.	0,002 (4)	0,03 (4)	0,02 (5)
PKC-β	n.u.	n.u.	0,030 – 0,032 (6)	0,0165 (5)
PKC-γ	n.u.	0,005 (4)	0,021 (4)	0,02 (5)
PKC-δ	n.u.	0,02 (4)	0,330 (7)	0,21
PKC-ϵ	n.u.	0,07 (4)	2 (7)	0,132
PKC-η	n.u.	0,004 (4)	0,157 (7)	n.u.
PKC-θ	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
PKC-μ	> 10	0,04	n.u.	2
PKC-ζ	n.u.	> 1 (4)	500 (7)	6
PKC-ι (λ)	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.

Tab. 4. Zusammenstellung der aus der Literatur bekannten IC_{50} -Werte (μ M) verschiedener PKC-Inhibitoren

- (1) Barret et al., 1993
 - (2) Meyer et al., 1989
 - (3) Budworth and Gescher, 1995
 - (4) Geiges et al., 1997
 - (5) Toullec et al., 1991
 - (6) Marte et al., 1994
 - (7) Hofmann et al., 1997
- n. u.: bisher nicht untersucht

Zur Durchführung der Adhäsionsversuche wurden die drei verschiedenen Matrixkomponenten Kollagen IV, Fibronectin und Laminin verwendet. Kollagen IV -aus dem Engelbreth Holm Swarm Sarkom (Maus) extrahiert- wurde von Sigma bezogen. Es wurde eine Stammkonzentration von 0,5 mg/ml in 0,25%iger Essigsäure hergestellt, die für mindestens 6 Monate bei 2-6°C aufbewahrt werden konnte. Das humane Plasma-Fibronectin wurde von Boehringer Mannheim als steriles Lyophilisat geliefert, in sterilem PBS gelöst und auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml verdünnt. Die rekonstituierte Lösung war bei -20°C stabil. Laminin lag in einer mit 0,05 M Tris-gepufferten 0,15 M NaCl-Lösung tiefgefroren vor und wurde bei -70°C gelagert. Es wurde nach den Angaben des Herstellers wie Kollagen IV aus der Basalmembran des Engelbreth Holm Swarm Sarkoms (Maus) extrahiert.

4.4 Adhäsionsassays an Komponenten der extrazellulären Matrix

Die Beschichtung der 96-Loch-Zellkulturplatten erfolgte im wesentlichen wie unlängst beschrieben (Engers et al., 1999). Die Stammlösungen von Fibronectin und Laminin wurden auf die gewünschte Endkonzentration von 0,2 µg/50 µl in PBS-Lösung verdünnt, um eine Beschichtung von 0,5 µg/cm² zu erhalten (Fläche eines „wells“: 0,4 cm²). In jedes „well“ einer 96-Loch-Zellkulturplatte wurden mit einer 8-Kanal-Pipette 50 µl einer Stammlösung der gewünschten extrazellulären Matrixkomponente pipettiert. Die 96-Loch-Zellkulturplatten wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Mit einer 8-Kanal-Pipette wurden die Überstände vorsichtig abgesaugt und 50 µl DMEM mit 10% FCS in jedes „well“ pipettiert. Daraufhin wurden die Zellkulturplatten für 30 min bei 37°C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen durch FCS zu blockieren. Das Zellkulturmedium wurde dann abpipettiert, so daß das Adhäsionsassay anschließend durchgeführt werden konnte.

In ähnlicher Weise erfolgte auch die Beschichtung der Zellkulturplatten mit Kollagen IV, jedoch wurde Kollagen IV in 0,25 %iger Essigsäure gelöst und die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C.

Für das Adhäsionsassay wurden zwei Tage vor der Messung expandierte Tumorzellen einer Zelllinie auf 5 verschiedene Zellkulturflaschen verteilt. Nachdem die Tumorzellen über Nacht adhärent geworden waren, wurde 24 Stunden vor der Messung das Medium jeder Zellkulturflasche dekantiert und durch ein Medium ersetzt, das den gewünschten PKC-Inhibitor in der richtigen Konzentration enthält. Der Kontrolle wurde in Abhängigkeit vom verwendeten PKC-Inhibitor DMSO in entsprechender Konzentration zugesetzt, wobei die Lichtempfindlichkeit der entsprechenden Lösungen durch Lichtprotektion berücksichtigt wurde. In einem Versuchsansatz wurden zwei verschiedene PKC-Inhibitoren mit jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen ausgetestet. Am Untersuchungstag wurden zehn 50ml-Zentrifugen-Röhrchen und zehn Neubauer-Zählkammern vorbereitet. Da Trypsin im Gegensatz zu EDTA bekanntermaßen nicht die Integrine beeinflusst, wurden die Zellen in jeder Zellkulturflasche mit einer 0,05%igen Trypsin-Lösung abgelöst, die Zellsuspension in 20 ml DMEM verdünnt und in ein Zentrifugenröhrchen gefüllt. Um das Trypsin zu entfernen, wurden die Zellen für 5 min bei 1000 U/min abzentrifugiert, der Überstand entfernt und unter Verwendung von 5 ml Nährmedium eine Einzelzellsuspension hergestellt. 200 µl der Suspension wurden in die Vertiefung einer Mikrowellplatte pipettiert, gründlich gemischt und 100 µl in eine neue Vertiefung überpipettiert. Diese wurden mit 100 µl Trypanblau-Gebrauchslösung versetzt, die aus PBS/Trypanblau-Stammlösung in einem Verhältnis von 2:1 bestand. Nach Füllung der Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen in acht Eckquadraten einer Zählkammer phasenkontrastmikroskopisch ausgezählt und die Konzentration der Zellen/ml Medium nach der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{\text{gezählte Zellen}}{8 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} \times 0,5} = \text{Zellen/ ml.}$$

Durch Zugabe von Medium wurde anschließend eine Endkonzentration von 10.000 Zellen/100 µl hergestellt. Diese Zellkonzentration wurde ausgewählt, da in Vorversuchen gezeigt werden konnte, daß sie bei dem verwendeten MTT-Assay (s.u.) im linearen Meßbereich liegt. In die zuvor mit den verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) beschichteten 96-Loch-Mikrotiterplatten wurden 100 µl/„well“ der jeweiligen Zellsuspension pipettiert, wobei alle Versuche als Dreifachansatz durchgeführt wurden. Die Spalten 1 + 2 der drei 96-Loch-Zellkulturplatten enthielten jeweils nur Medium, die Spalten 3 + 4 jeweils die vorbehandelten bzw. DMSO-behandelten Kontrollzellen, die Spalten 5 + 6 jeweils Zellen mit der ersten Substanz in niedriger Konzentration, die Spalten 7 + 8 jeweils Zellen mit der ersten Substanz in hoher Konzentration, die Spalten 9–12 jeweils entsprechend Zellen mit der zweiten Substanz in niedriger bzw. hoher Konzentration. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten für 30 min im Feuchtinkubator inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die für den Meßvorgang erforderliche MTT-Lösung (MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) vorbereitet: 20 mg MTT wurden in 20 ml PBS aufgelöst und mit Medium 1:5 verdünnt. Für drei Mikrotiterplatten wurden ca. 75 ml MTT-Lösung benötigt. Nach Ablauf der Adhäsionszeit wurden die Überstände der Platten vorsichtig dekantiert und die „wells“ dreimal mit jeweils 100 µl Zellkulturmedium vorsichtig gewaschen, um nicht adhärent gewordene Zellen zu entfernen.

Die Anzahl der adhärenen Tumorzellen wurde indirekt photometrisch über das MTT-Assay bestimmt. Dieses Assay basiert auf der Reduktion von MTT durch eine mitochondriale Succinyldehydrogenase lebender Zellen (Miki et al., 1993). Die dabei entehenden Formazan-Kristalle werden durch eine zehnminütige Exposition mit DMSO gelöst und die Farbintensität anschließend mit einem Photometer (Titertek Multiscan Plus MKII) bei 570 nm bestimmt. Zur Bestimmung der Anzahl adhärenter Zellen wurden mit einer Multipipette in jedes „well“ 250 µl MTT-Lösung pipettiert. Nach vierstündiger Inkubation im Feuchtinkubator wurden die Überstände dekantiert und in jedes „well“ 150 µl DMSO-Lösung pipettiert. Um eine homogene Lösung zu erhalten, wurden die Mikrotiterplatten für 10 min auf eine bei niedriger Geschwindigkeit (500 U/min) rotierende, geschlossene Zentrifuge gestellt. Anschließend erfolgte die Extinktionsmessung mit Hilfe eines Photometers. Die Anzahl adhärenter Zellen im Vergleich zur Kontrolle wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\begin{array}{l} \% \text{ adhärenter Zellen} \\ \text{im Vergleich zur Kontrolle} \end{array} = \frac{\text{Absorption der Probe} - \text{Absorption des Leerwerts}}{\text{Absorption der Kontrolle} - \text{Absorption des Leerwerts}} \times 100$$

Die Ergebnisse des MTT-Assays wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Schiketanz (Institut für Statistik, Universitätsklinik Mainz) statistisch mit Hilfe des t-Test-Verfahrens ausgewertet. Verschiedene Arbeiten belegen die Anwendbarkeit des MTT-Assays zur Bestimmung der Zell-Substratadhäsion. Furukawa et al. zeigte, daß die über das MTT-Assay bestimmte *in vitro*-Adhäsion humaner Kolonkarzinomzelllinien an extrazelluläre Matrixproteine mit der experimentellen und klinischen Lebermetastasierung signifikant korreliert (1993). Das aktivierte Lansoprazol AG-2000, ein mit SH-Gruppen interagierender Inhibitor von Protonenpumpen, inhibierte im MTT-Assay dosisabhängig die Adhäsion einer humanen Pankreaskarzinomzelllinie an Laminin, Fibronectin und Kollagen IV und verhinderte *in vivo* die peritoneale Implantation der Tumorzellen in der Nacktmaus (Ohta et al., 1999). Die Adhäsion von Nierenepithelzellen an polymere Oberflächen, die mit den oben genannten EZM-Komponenten beschichtet wurden, wurde ebenfalls mittels des MTT-Assays ausgewertet (Kanai et al., 1999). Das MTT-Assay hat sich daher als eine etablierte Methode für die Untersuchung der *in vitro*-Adhäsion von Tumorzellen bewährt.

4.5 Endothelzellisolation

Um die Interaktion von Tumorzellen mit Endothelzellen untersuchen zu können, wurden humane Nabelschnurendothelien mit Hilfe eines Kollagenaseverdaus isoliert. Hierzu wurden Nabelschnüre mit einer Länge von mindestens 15 cm von normalen Geburten oder Sektionen caesareae unmittelbar nach Geburt in sterilem Nabelschnur-Puffer und bis zur weiteren Verarbeitung innerhalb von 12 h bei 4 °C aufbewahrt. Der Nabelschnurpuffer bestand aus 500 ml sterilem PBS, dem 1,09 g Glukose und 2% Penicillin/ Streptomycin (pH 7,4) zugesetzt wurden.

Um eine bessere Adhärenz der Endothelzellen zu gewährleisten, wurden vorab Zellkulturflaschen mit Gelatine beschichtet. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß die Adhärenz an Gelatine größer als an Fibronectin gewesen war. Zur Herstellung 2%iger Gelatine wurden 2g Gelatine in 100ml Aqua dest aufgekocht und steril filtriert. Etwa 3 ml dieser Lösung wurden in eine Zellkulturflasche gegeben, so daß die Oberfläche komplett bedeckt war. Nach mindestens zweistündiger Inkubation der Kulturflaschen bei 37 °C in einem Feuchtinkubator wurde die Lösung mit einer Einmalpipette vom Rand her entfernt, ohne dabei mit der Pipette die beschichtete Oberfläche zu berühren. Unter Zugabe von 5 ml DMEM konnten die Kulturgefäße mehrere Tage im Brutschrank aufbewahrt werden. Vor ihrer Verwendung wurde dann das Kulturmedium abpipettiert.

Die Endothelzellisolation erfolgte modifiziert nach dem Protokoll von Jaffe et al (1973). Unter sterilen Bedingungen wurde die Nabelschnur aus dem Transportgefäß entnommen, auf

einem sterilen Abdecktuch ausgebreitet, die beiden Präparatenden gekürzt, von beiden Seiten Braunülen in die Nabelschnurvene eingeführt und mit Nahtmaterial fixiert. Über die Verweilkanülen wurde die Vene von jeder Seite mit ca. 50 ml Nabelschnurpuffer gespült. Danach wurde eine der Braunülen mit einem Adapter verschlossen, so daß über die zweite Braunüle eine 0,1%ige Kollagenase-Lösung appliziert werden konnte. Die Konzentration der Kollagenase-Lösung entsprach dabei den Empfehlungen der Firma Boehringer Mannheim (Roche). Die rekonstituierte Lösung ist bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ stabil. Dabei handelt es sich nach der Produktbeschreibung in diesen Fall um eine Clostridiopeptidase A, die aus einem extrazellulärem Kulturfiltrat des *Clostridium histolyticum* extrahiert worden ist. Der Vorteil der Kollagenase gegenüber anderen Enzymen liegt in der selektiven Andauung der sub-endothelialen Basalmembran unter Schonung der Zellmembran und eines Großteils der Membranglykoproteine. Um den Kollagenase-Verdau zu optimieren, wurde die Nabelschnur für 7 min in Nabelschnurpuffer bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Eine Verlängerung der Inkubationszeit mit Kollagenase A führte nach eigenen Erfahrungen zur Andauung und Zerstörung angrenzender Gewebsstrukturen, was zur Kontamination der Endothelzellkultur mit glatten Muskelzellen und Fibroblasten führte. Nach 7-minütigem Kollagenase-Verdau wurde einer der beiden Zugänge geöffnet und die Nabelschnur unter sterilen Bedingungen mit dem offenen Ende über einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen ausgestrichen. Die Vene wurde erneut über beide Braunülen mit jeweils 50 ml Nabelschnurpuffer gespült, wobei der Puffer in zwei 50 ml-Zentrifugenröhrchen aufgefangen und die Nabelschnur wiederholt ausgestrichen wurde. Beide 50 ml-Röhrchen wurden bei 1700 U/min für 5 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert, das Pellet mit jeweils 5 ml DMEM suspendiert und in die bereitgestellten Zellkulturflaschen pipettiert. Spätestens am nächsten Tag wurde der Boden der Zellkulturflasche vorsichtig mit frischem Medium gespült, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Nach 5 Tagen lagen konfluente Monolayer vor. Die Identität dieser Zellen als Endothelzellen wurde immunhistochemisch mit Hilfe eines Antikörpers gegen den Faktor VIII verifiziert.

4.6 Endothelzellkultur

Die Zellkulturgefäße wurden im Brutschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5% CO_2 inkubiert. In Anlehnung an das Protokoll von Jaffe et al. (1973) wurden die Endothelzellen dreimal wöchentlich über einen kompletten Mediumwechsel versorgt. In Vorversuchen wurde das optimale Zellkulturmedium bestimmt. Hierzu wurden Passagen derselben Mutterlinie entweder in DMEM ohne jegliche Zusätze oder, wie von Jaffe et al. 1973 beschrieben, in Medium 199 kultiviert. Letzteres enthält bereits Earl's-Salze und $2,2\text{ g/l NaHCO}_3$ (Gibco 043-05030), so daß wir lediglich 20%iges fötales Kälberserum, 1% Penicillin-Streptomycin und 1% L-Glutamin

hinzusetzten (Jaffe et al., 1972). Bei diesen Versuchen stellte sich heraus, daß sich die mit DMEM inkubierten Endothelzellen morphologisch und hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens in keinsten Weise von den mit modifiziertem M199 versorgten Endothelzellen unterschieden. Da die Tumorzellen standardgemäß in DMEM inkubiert werden und in den Adhäsionsassays an Endothelzellmonolayer nur ein Medium verwendet werden kann, entschieden wir uns, auch die Endothelzellen in DMEM zu kultivieren.

Um die Wachstumsbedingungen der Endothelzellen zu verbessern, wurde dem Kulturmedium der Wachstumsfaktor „Endothelial cell growth supplement“ (ECGS) in einer Konzentration von 50 µg/ml zugegeben. ECGS wurde in lyophilisierter Form von Sigma bezogen (Prod. No. E-2759). 15 mg ECGS wurden in 5 ml PBS gelöst. Die Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Vorversuche zeigten, daß der Zusatz von Heparin (Sigma, H-3393 Lot 93H0166) in einer Konzentration von 1 Unit/ml die Ansprechbarkeit der Endothelzelllinien auf ECGS nicht wesentlich verbesserte.

Die Passage der Endothelzellen erfolgte mit 0,1% Trypsin und 0,05% EDTA, wobei die Ablösung vom Kulturboden nur wenige Minuten benötigte. Die Zellsuspension wurde dann mit einer mit 10 ml gefüllten Pipette aufgenommen, in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und für 10 min bei 1000 U/min abzentrifugiert, um Trypsin und EDTA möglichst vollständig zu eliminieren. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet mit 10 ml Medium resuspendiert und auf zwei nicht beschichtete Zellkultur-Gefäße verteilt. In Anlehnung an McGregor et al. (1994) wurde im Rahmen der weiteren Kultivierung auf eine Beschichtung der Zellkulturflaschen verzichtet, da sich in Vorversuchen herausstellte, daß die Beschichtung mit Gelatine die Adhärenz der Endothelzellen zwar unmittelbar nach der Isolation aus Nabelschnüren begünstigte, jedoch bei späteren Passagen gegenüber einem nicht beschichteten Zellkulturboden keine Vorteile zeigte.

4.7 Fixation von Endothelzellen zu immunhistochemischen Untersuchungen

Da Endothelzellen im Laufe der Kultivierung *in vitro* bekanntermaßen zunehmend entdifferenzieren, wurde immunhistochemisch die Expression des Endothelzell-spezifischen Differenzierungsmarkers Faktor VIII in Abhängigkeit von der Passagedauer bestimmt. Hierzu wurden Endothelzellen abgelöst und zentrifugiert. Das Pellet wurde in ca. 1,5–2 ml Kulturmedium resuspendiert und die Lösung auf sterile Objektträger in eine Petrischale aufpipettiert. Nach Anhaften der Zellen an die Objektträger wurden die Petrischalen mit jeweils 15-20 ml Medium aufgefüllt und die Zellen über 2-3 Tage kultiviert. Daraufhin wurden die Objektträger in einer isotonen NaCl-Lösung ab gespült, für 5 min in Methanol, 10 sec in Aceton fixiert und anschließend getrocknet. Bis zur Untersuchung wurden die

Objektträger bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die immunhistochemische Untersuchung mit dem Endothelzellmarker Faktor VIII (Dako) ergab, daß bis zur 7. Passage mehr als 90 % der Endothelzellen immunreaktiv und damit differenziert waren.

4.8 Adhäsionsassays an Endothelzellen

Aufgrund der unter 4.7 beschriebenen Ergebnisse wurden nur Endothelzellen bis zur Passage 5 verwendet. Diese Zellen wurden in einer Konzentration von 10.000 Zellen/100 μl „well“ in 96er Loch-Zellkulturplatten ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz (nach durchschnittlich zwei Tagen) heranwachsen lassen. Analog zu den Adhäsionsversuchen an die extrazelluläre Matrix wurde den zu analysierenden Tumorzellen der jeweils gewünschte PKC-Inhibitor in der entsprechenden Konzentration zugesetzt, wobei in einem Versuchsansatz zwei Substanzen mit jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen zur Anwendung kamen. Die höchste DMSO-Konzentration, die dabei erreicht wurde, wurde dem Kulturmedium für die Kontrolle zugefügt, um mögliche DMSO-induzierte Effekte auf das Ergebnis auszuschließen. Am Versuchstag wurden die Tumorzellen mittels 0,1% Trypsin abgelöst, in 50 ml-Zentrifugenröhrchen umgefüllt, bei 1000 U/min abzentrifugiert, mit 5 ml Kulturmedium (DMEM + Zusätze) aufgenommen, gezählt und in einem bereitgestellten Zentrifugenröhrchen auf eine Endkonzentration von 10.000 Zellen/100 μl des jeweiligen Untersuchungsmediums verdünnt. Während des Zentrifugationsvorganges wurde aus jedem „well“ der mit Endothelzellen bewachsenen 96-Loch-Zellkulturplatten mit Hilfe einer 8-Kanalpipette vorsichtig das Medium entnommen, ohne den Monolayer zu zerstören. In jedes „well“ wurden dann 100 μl der Tumorzellsuspension pipettiert. Es folgte eine Inkubation über 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Feuchtinkubator. Anschließend wurden nicht adhärente Tumorzellen entfernt, indem, wie unter 4.4 beschrieben, die Überstände dekantiert und die verbliebenen adhärennten Zellen dreimal vorsichtig mit jeweils 100 μl DMEM gewaschen wurden. Nachfolgend wurden in jedes „well“ 250 μl MTT-Lösung (50 μl MTT + 200 μl Medium) pipettiert und die Mikrotiterplatten für vier Stunden bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Überstände wurden schließlich entfernt und durch 150 μl DMSO/„well“ ersetzt. Nach zehnminütiger Inkubation erfolgte die Extinktionsmessung. Bei jedem Versuch wurden drei Mikrotiterplatten im Parallelansatz ausgewertet.

5 Ergebnisse

Die Bedeutung der PKC für das Adhäsionsverhalten verschiedener Zelllinien humaner Nierenzellkarzinome und epitheloidzelliger Sarkome an unterschiedliche extrazelluläre Matrixkomponenten und an Endothelzellen wurde unter Verwendung verschiedener PKC-Inhibitoren untersucht. Die dabei erzielten Ergebnisse waren außerordentlich heterogen, wobei es nicht nur Unterschiede zwischen den verschiedenen Tumorzelllinien, sondern auch zwischen den verwendeten Matrixkomponenten gab.

5.1 Effekte von Inhibitoren der Proteinkinase C auf das Adhäsionsverhalten humaner Nierenkarzinomzelllinien an verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix

Da die Nierenkarzinomzelllinien clearCa-5, -14, -19, -28 und -39 jeweils die fünf PKC-Isoenzyme PKC- α , - ϵ , - ι , - μ , - ζ exprimierten, wurden die Effekte der verschiedenen PKC-Inhibitoren auf das Adhäsionsverhalten dieser Zelllinien miteinander verglichen (Tab. 5, 6 und Abb.4-6). Staurosporin förderte signifikant die Adhäsion der Nierenkarzinomzelllinien clearCa-5, -19 und -39 an Fibronectin. Zusätzlich wurde bei der Zelllinie clearCa-19 die Adhäsion an Laminin und bei der Zelllinie clearCa-39 die Adhäsion an Kollagen IV gefördert. Ähnliche Effekte wie für Staurosporin wurden auch mit H7 erzielt. Die Adhäsion der Zelllinie clearCa-5 an Fibronectin und der Zelllinie clearCa-19 an Fibronectin und Laminin wurde durch alle vier untersuchten PKC-Inhibitoren gesteigert. Der selektive PKC-Inhibitor GF 109203X förderte bei der Zelllinie clearCa-5 signifikant die Adhäsion an alle drei EZM-Komponenten. Bei der Zelllinie clearCa-39 kam es durch alle PKC-Inhibitoren zu einem Adhäsionsanstieg an Kollagen IV, die Adhäsion an Fibronectin wurde durch Staurosporin, H7 und den selektiven PKC-Inhibitor CGP 41251 gesteigert. Die Adhäsion der Zelllinie clearCa-28 an Fibronectin und Kollagen IV wurde durch die drei PKC-Inhibitoren, H7, CGP 41251 und GF 109203X signifikant gefördert.

Eine weitere Nierenkarzinomzelllinie, clearCa-14, die dieselben PKC-Isoenzyme exprimierte wie die oben genannten Zelllinien clearCa-5, -19, -28 und -39, zeigte unter dem Einfluß der PKC-Inhibitoren ein von den anderen vier Zelllinien abweichendes Adhäsionsverhalten (Tab. 5 und 6). Die durch die PKC-Inhibitoren signifikant erzielten Effekte resultierten nahezu ausschließlich in einer Adhäsionshemmung an die jeweilige extrazelluläre Matrixkomponente. So inhibierten die PKC-Inhibitoren Staurosporin, GF 109203X und CGP 41251 die Adhäsion dieser Zelllinie an Kollagen IV, wobei die beiden Letzteren, ähnlich wie H7, auch die Adhäsion an Laminin hemmten. Nur die Adhäsion an Fibronectin wurde durch Stauro-

sporin und CGP 41251 signifikant gesteigert, während GF 109203X und H7 auch hier die Adhäsion inhibierten.

Während die Adhäsion der Zelllinie clearCa-5 durch die verschiedenen PKC-Inhibitoren nur im Sinne einer gesteigerten Zell-Substratadhäsion beeinflusst wurde, fanden sich bei den übrigen drei Zelllinien, clearCa-19, -28 und -39 auch inhibitorische Effekte. Das Adhäsionsverhalten der Zelllinien clearCa-19 an Kollagen IV sowie clearCa-28 und clearCa-39 an Laminin wurde durch H7 und die selektiveren PKC-Inhibitoren GF 109203X und CGP 41251 signifikant gehemmt.

Die Zelllinien clearCa-3, -11 und -12 exprimieren nur einen Teil der für die Nierenzellkarzinome beschriebenen fünf PKC-Isoenzyme (Engers et al, 2000). Bei der Nierenkarzinomzelllinie clearCa-3, der das PKC-Isoenzym PKC- ι fehlte, wurde – vergleichbar mit den Nierenkarzinomzelllinien, die alle fünf PKC-Isoenzyme exprimierten – die Adhäsion an Fibronectin durch GF 109203X, CGP 41251 und H7, die Adhäsion an Laminin durch GF 109203X signifikant gesteigert. Staurosporin hemmte die Adhäsion an Laminin und Kollagen IV, CGP 41251 die Adhäsion an Kollagen IV (Tab. 5 und Abb. 4-6). Bei der Nierenkarzinomzelllinie clearCa-12, die die PKC-Isoenzyme PKC- ι und- μ nicht exprimierte, wurde die Adhäsion an alle drei EZM-Komponenten durch die PKC-Inhibitoren Staurosporin, H7 und GF 109203X signifikant gehemmt (Tab. 5 und 6). Nur CGP 41251 führte an Laminin und Kollagen IV zu einem Adhäsionsanstieg der Zelllinie clearCa-12.

Auch bei der Zelllinie clearCa-11, die nur noch die beiden PKC-Isoenzyme PKC- α und - ζ exprimierte, überwog ein durch die PKC-Inhibitoren induzierter inhibitorischer Effekt auf das Adhäsionsverhalten (Tab. 5). So wurde die Adhäsion an Laminin durch alle vier PKC-Inhibitoren signifikant gehemmt. Die Adhäsion an Fibronectin wurde durch Staurosporin inhibiert, durch CGP 41251 und H7 hingegen gesteigert. Die Adhäsion der Zelllinie clearCa-11 an Kollagen IV blieb von den PKC-Inhibitoren unbeeinflusst.

A

clearCa-5, Fibronektin		clearCa-5, Laminin		clearCa-5, Kollagen IV	
Staurosporin 1nM	99 ± 3	Staurosporin 1nM	109 ± 7	Staurosporin 1nM	107 ± 5
Staurosporin 10nM	126 ± 4 **	Staurosporin 10nM	92 ± 4	Staurosporin 10nM	101 ± 12
GF 109203X 50nM	111 ± 0.2 **	GF 109203X 50nM	113 ± 9	GF 109203X 50nM	103 ± 9
GF 109203X 0.5µM	123 ± 1 **	GF 109203X 0.5µM	121 ± 5 *	GF 109203X 0.5µM	114 ± 5 *
CGP 41251 0.5nM	115 ± 4 *	CGP 41251 0.5nM	99 ± 1	CGP 41251 0.5nM	98 ± 2
CGP 41251 5nM	127 ± 5 **	CGP 41251 5nM	110 ± 10	CGP 41251 5nM	115 ± 6 *
H7 10µM	117 ± 4 *	H7 10µM	95 ± 4	H7 10µM	98 ± 18
H7 100µM	130 ± 2 **	H7 100µM	82 ± 13	H7 100µM	105 ± 17

B

clearCa-19, Fibronektin		clearCa-19, Laminin		clearCa-19, Kollagen IV	
Staurosporin 1nM	118 ± 1 ***	Staurosporin 1nM	113 ± 5 *	Staurosporin 1nM	95 ± 19
Staurosporin 10nM	142 ± 3 **	Staurosporin 10nM	136 ± 3 **	Staurosporin 10nM	87 ± 11
GF 109203X 50nM	117 ± 3 **	GF 109203X 50nM	112 ± 2 *	GF 109203X 50nM	80 ± 3 **
GF 109203X 0.5µM	114 ± 0.5 ***	GF 109203X 0.5µM	130 ± 3 **	GF 109203X 0.5µM	82 ± 3 *
CGP 41251 0.5nM	114 ± 5 *	CGP 41251 0.5nM	123 ± 1 ***	CGP 41251 0.5nM	82 ± 4 *
CGP 41251 5nM	137 ± 3 **	CGP 41251 5nM	137 ± 2 **	CGP 41251 5nM	80 ± 3 **
H7 10µM	100 ± 1	H7 10µM	118 ± 11	H7 10µM	93 ± 4
H7 100µM	110 ± 2 *	H7 100µM	132 ± 4 **	H7 100µM	87 ± 1 **

C

clearCa-28, Fibronektin		clearCa-28, Laminin		clearCa-28, Kollagen IV	
Staurosporin 1nM	87 ± 1 ***	Staurosporin 1nM	98 ± 3	Staurosporin 1nM	95 ± 5
Staurosporin 10nM	97 ± 1 *	Staurosporin 10nM	93 ± 4	Staurosporin 10nM	94 ± 7
GF 109203X 50nM	123 ± 6 *	GF 109203X 50nM	104 ± 3	GF 109203X 50nM	120 ± 3 **
GF 109203X 0.5µM	112 ± 5 *	GF 109203X 0.5µM	81 ± 6 *	GF 109203X 0.5µM	113 ± 1 **
CGP 41251 0.5nM	118 ± 6 *	CGP 41251 0.5nM	78 ± 3 *	CGP 41251 0.5nM	117 ± 2 **
CGP 41251 5nM	146 ± 11 *	CGP 41251 5nM	77 ± 4 *	CGP 41251 5nM	141 ± 5 **
H7 10µM	116 ± 3 *	H7 10µM	73 ± 2 **	H7 10µM	108 ± 4
H7 100µM	116 ± 6 *	H7 100µM	73 ± 4 **	H7 100µM	113 ± 5 *

D

clearCa-39, Fibronektin		clearCa-39, Laminin		clearCa-39, Kollagen IV	
Staurosporin 1nM	181 ± 20 *	Staurosporin 1nM	94 ± 5	Staurosporin 1nM	117 ± 7 *
Staurosporin 10nM	198 ± 27 *	Staurosporin 10nM	103 ± 3	Staurosporin 10nM	117 ± 3 *
GF 109203X 50nM	106 ± 6	GF 109203X 50nM	71 ± 5 **	GF 109203X 50nM	108 ± 3
GF 109203X 0.5µM	95 ± 4	GF 109203X 0.5µM	58 ± 4 **	GF 109203X 0.5µM	110 ± 2 *
CGP 41251 0.5nM	152 ± 6 **	CGP 41251 0.5nM	67 ± 5 **	CGP 41251 0.5nM	127 ± 10 *
CGP 41251 5nM	147 ± 13 *	CGP 41251 5nM	60 ± 3 **	CGP 41251 5nM	147 ± 7 **
H7 10µM	146 ± 11 *	H7 10µM	56 ± 3 **	H7 10µM	134 ± 7 *
H7 100µM	149 ± 12 *	H7 100µM	72 ± 3 **	H7 100µM	157 ± 7 **

E

clearCa-12, Fibronektin		clearCa-12, Laminin		clearCa-12, Kollagen IV	
Staurosporin 1nM	77 ± 2 **	Staurosporin 1nM	80 ± 3 **	Staurosporin 1nM	84 ± 2 **
Staurosporin 10nM	61 ± 2 **	Staurosporin 10nM	77 ± 3 **	Staurosporin 10nM	63 ± 4 **
GF 109203X 50nM	66 ± 1 ***	GF 109203X 50nM	86 ± 3 *	GF 109203X 50nM	70 ± 2 **
GF 109203X 0.5µM	67 ± 1 ***	GF 109203X 0.5µM	74 ± 4 *	GF 109203X 0.5µM	66 ± 1 ***
CGP 41251 0.5nM	96 ± 8	CGP 41251 0.5nM	117 ± 7 *	CGP 41251 0.5nM	115 ± 4 *
CGP 41251 5nM	93 ± 10	CGP 41251 5nM	112 ± 2 **	CGP 41251 5nM	115 ± 1 ***
H7 10µM	96 ± 7	H7 10µM	87 ± 3 *	H7 10µM	83 ± 5 *
H7 100µM	75 ± 7 *	H7 100µM	88 ± 7	H7 100µM	67 ± 3 **

F

clearCa-11, Fibronektin		clearCa-11, Laminin		clearCa-11, Kollagen IV	
Staurosporin 1nM	90 ± 6	Staurosporin 1nM	86 ± 4 *	Staurosporin 1nM	102 ± 3
Staurosporin 10nM	72 ± 0.5 ***	Staurosporin 10nM	79 ± 2 **	Staurosporin 10nM	103 ± 5
GF 109203X 50nM	102 ± 2	GF 109203X 50nM	90 ± 7	GF 109203X 50nM	110 ± 8
GF 109203X 0.5µM	98 ± 1	GF 109203X 0.5µM	85 ± 6	GF 109203X 0.5µM	94 ± 10
CGP 41251 0.5nM	110 ± 1 **	CGP 41251 0.5nM	81 ± 1 **	CGP 41251 0.5nM	90 ± 5
CGP 41251 5nM	116 ± 2 **	CGP 41251 5nM	76 ± 3 **	CGP 41251 5nM	104 ± 4
H7 10µM	123 ± 2 **	H7 10µM	78 ± 6 *	H7 10µM	91 ± 9
H7 100µM	120 ± 9	H7 100µM	52 ± 3 **	H7 100µM	88 ± 5

G

clearCa-14, Fibronektin		clearCa-14, Laminin		clearCa-14, Kollagen IV	
Staurosporin 1nM	87 ± 1 **	Staurosporin 1nM	99 ± 6	Staurosporin 1nM	80 ± 2 **
Staurosporin 10nM	125 ± 1 **	Staurosporin 10nM	87 ± 10	Staurosporin 10nM	77 ± 5 *
GF 109203X 50nM	83 ± 3 *	GF 109203X 50nM	95 ± 16	GF 109203X 50nM	91 ± 5
GF 109203X 0.5µM	98 ± 1	GF 109203X 0.5µM	65 ± 14 *	GF 109203X 0.5µM	80 ± 2 **
CGP 4125 0.5nM	115 ± 4 *	CGP 4125 0.5nM	85 ± 3 *	CGP 4125 0.5nM	76 ± 2 **
CGP 41251 5nM	112 ± 4	CGP 41251 5nM	80 ± 4 *	CGP 41251 5nM	91 ± 1 **
H7 10µM	118 ± 8	H7 10µM	87 ± 1 **	H7 10µM	104 ± 5
H7 100µM	72 ± 2 **	H7 100µM	95 ± 1 *	H7 100µM	104 ± 3

H

clearCa-3, Fibronektin		clearCa-3, Laminin		clearCa-3, Kollagen IV	
Staurosporin 1nM	99 ± 3	Staurosporin 1nM	91 ± 2 *	Staurosporin 1nM	81 ± 4 *
Staurosporin 10nM	89 ± 4	Staurosporin 10nM	98 ± 6	Staurosporin 10nM	63 ± 4 **
GF 109203X 50nM	116 ± 8	GF 109203X 50nM	99 ± 8	GF 109203X 50nM	100 ± 7
GF 109203X 0.5µM	119 ± 6 *	GF 109203X 0.5µM	121 ± 7 *	GF 109203X 0.5µM	80 ± 9
CGP 41251 0.5nM	122 ± 5 *	CGP 41251 0.5nM	92 ± 3	CGP 41251 0.5nM	93 ± 2 *
CGP 41251 5nM	83 ± 2 **	CGP 41251 5nM	95 ± 6	CGP 41251 5nM	98 ± 1
H7 10µM	102 ± 0.1 **	H7 10µM	104 ± 2	H7 10µM	103 ± 2
H7 100µM	129 ± 3 **	H7 100µM	87 ± 10	H7 100µM	95 ± 9

Tab.5. Effekte der PKC-Inhibitoren Staurosporin, GF 109203X, CGP 41251 und H7 auf das Adhäsionsverhalten humaner Nierenkarzinomzelllinien an verschiedene Substrate der extrazellulären Matrix.

A, clearCa-5; B, clearCa-19; C, clearCa-28; D, clearCa-39; E, clearCa-12; F, clearCa-11; G, clearCa-14; H, clearCa-3. A-D: Nierenkarzinomzelllinien mit vorwiegend adhäsionssteigernden Effekten; E-G: Nierenkarzinomzelllinien mit vorwiegend inhibiertem Adhäsionsverhalten; F-H: Nierenkarzinomzelllinien, deren Adhäsion durch die PKC-Inhibitoren in abnehmender Reihenfolge deutlich weniger beeinflusst wird. Die angegebenen Werte entsprechen Mittelwerten und Standardabweichungen in % im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle, die per definitionem mit 100% angesetzt wurde. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe eines t-Testes: *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$.

	Adhäsion an	Staurosporin	GF 109203X	CGP 41251	H7
ClearCa-5	Fibronektin	↑	↑	↑	↑
	Laminin	~	↑	~	~
	Kollagen IV	~	↑	↑	~
	HUVEC	~	↑	↑	~
ClearCa-19	Fibronektin	↑	↑	↑	↑
	Laminin	↑	↑	↑	↑
	Kollagen IV	~	↓	↓	↓
ClearCa-28	Fibronektin	↓	↑	↑	↑
	Laminin	~	↓	↓	↓
	Kollagen IV	~	↑	↑	↑
ClearCa-39	Fibronektin	↑	~	↑	↑
	Laminin	~	↓	↓	↓
	Kollagen IV	↑	↑	↑	↑
ClearCa-12	Fibronektin	↓	↓	~	↓
	Laminin	↓	↓	↑	↓
	Kollagen IV	↓	↓	↑	↓
	HUVEC	↓	↓	~	↓
ClearCa-11	Fibronektin	↓	~	↑	↑
	Laminin	↓	↓	↓	↓
	Kollagen IV	~	~	~	~
	HUVEC	~	~	~	~
ClearCa-14	Fibronektin	↑	↓	↑	↓
	Laminin	~	↓	↓	↓
	Kollagen IV	↓	↓	↓	~
	HUVEC	~	~	~	~
ClearCa-3	Fibronektin	~	↑	↑	↑
	Laminin	↓	↑	~	~
	Kollagen IV	↓	~	↓	~

Tab. 6. Schematische Zusammenstellung der Effekte verschiedener PKC-Inhibitoren auf das Adhäsionsverhalten humaner Nierenkarzinomzelllinien an Substrate der extrazellulären Matrix und Endothelzellen (HUVEC). In abnehmender Reihenfolge sind zunächst diejenigen Nierenkarzinomzelllinien aufgeführt, deren Adhäsion durch die PKC-Inhibitoren im wesentlichen gesteigert wurde (↑), gefolgt von Nierenkarzinomzelllinien, deren Adhäsion im wesentlichen inhibiert wurde (↓), um mit denjenigen Zelllinien abzuschließen, deren Adhäsionsverhalten deutlich weniger häufig signifikant beeinflusst wurde.

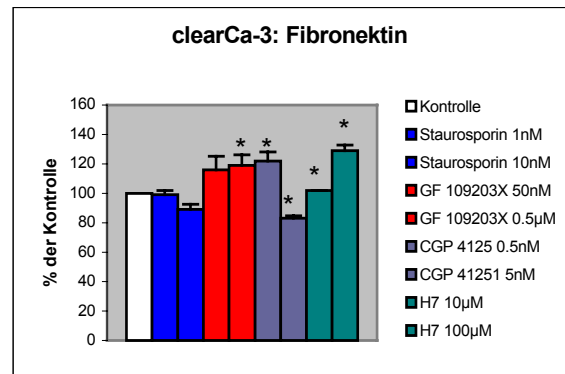
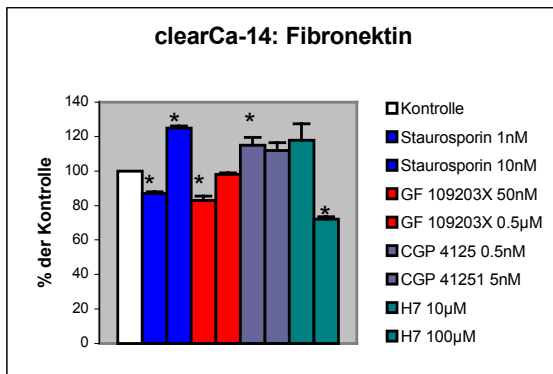
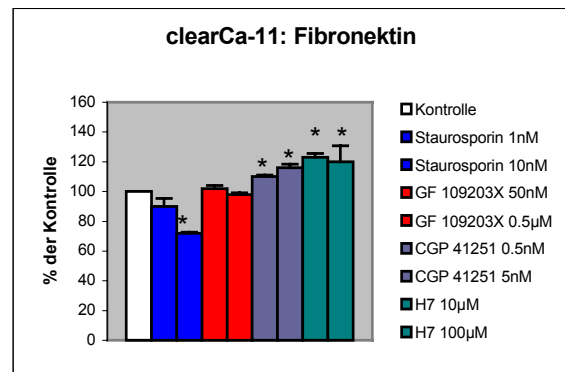
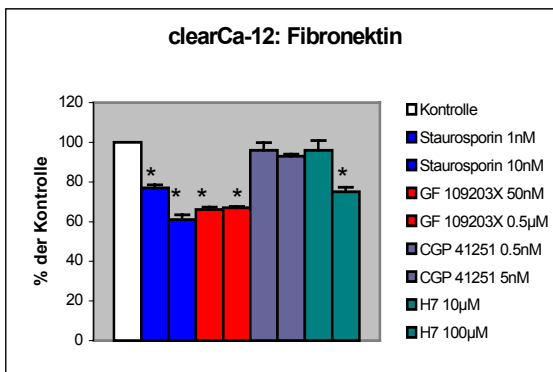
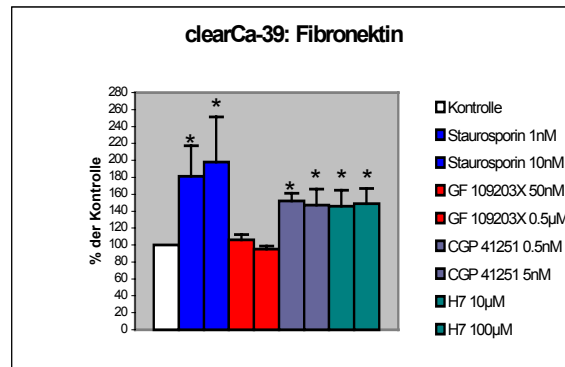
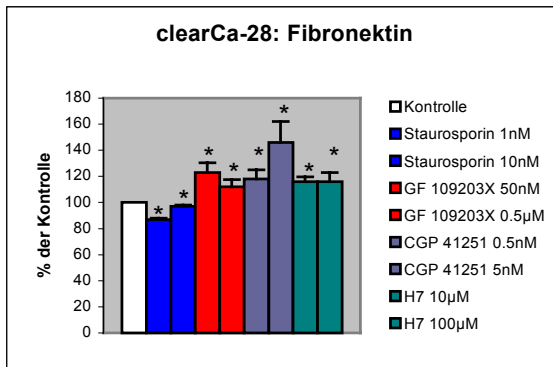
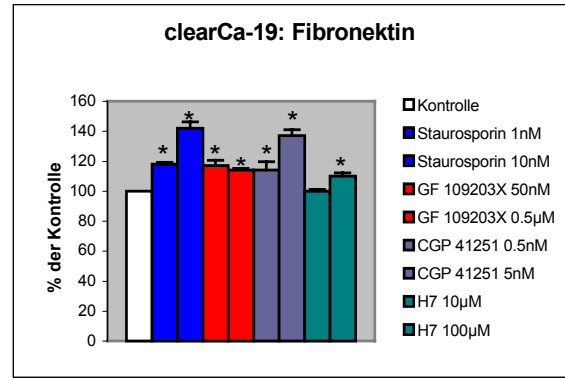
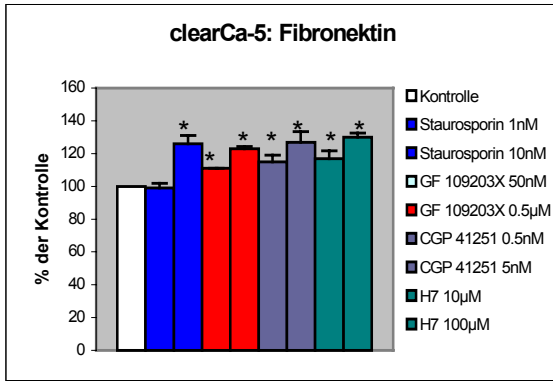


Abb. 4. Vergleichende Gegenüberstellung der Effekte verschiedener PKC-Inhibitoren auf die Adhäsion humaner Nierenkarzinomzelllinien an Fibronektin. *, statistisch signifikant im t-Test (zum genaueren Signifikanzniveau vgl. Tab. 5).

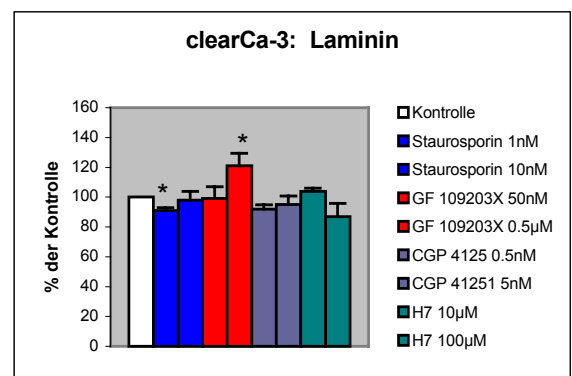
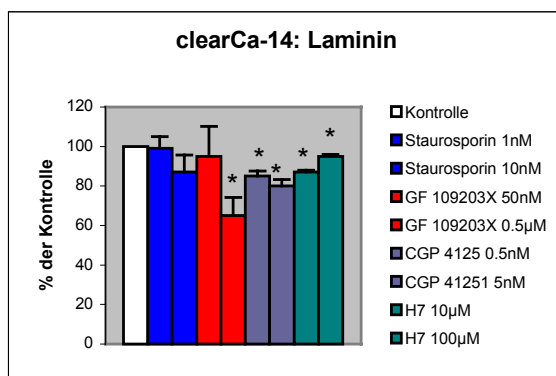
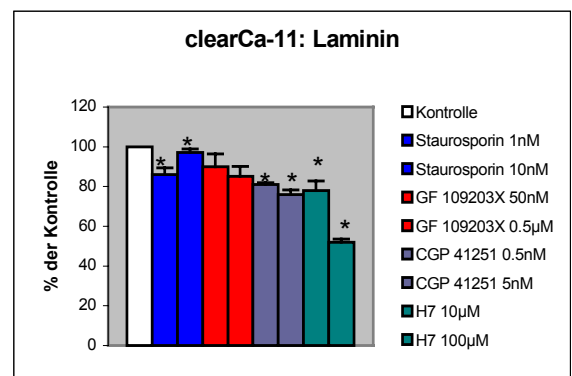
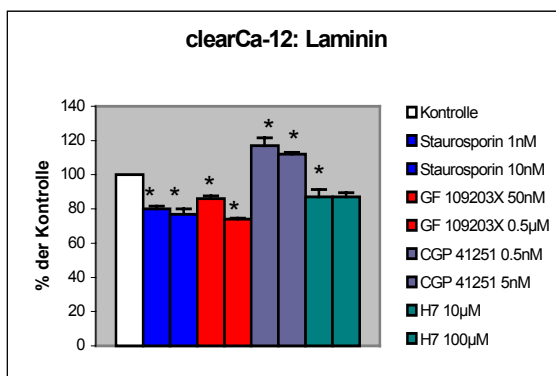
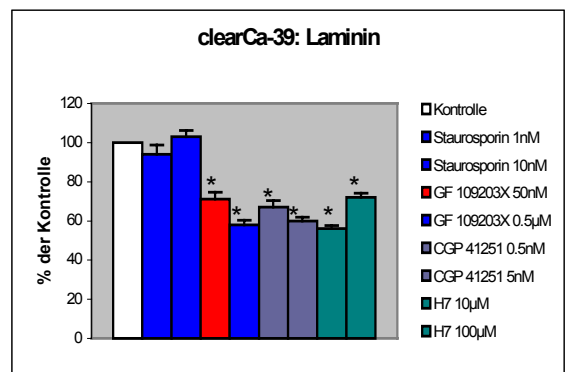
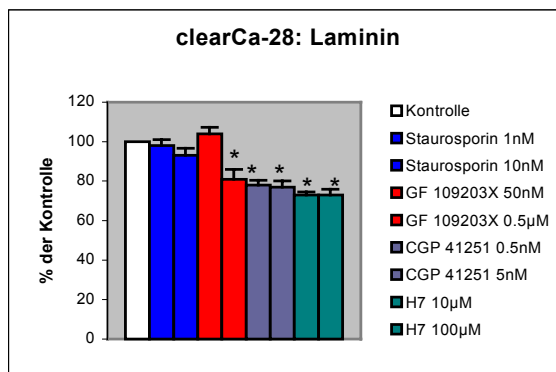
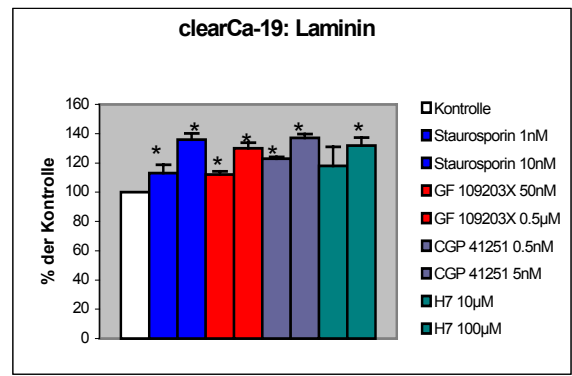
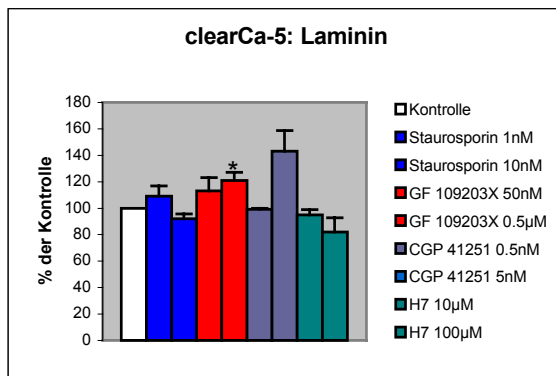


Abb. 5. Vergleichende Gegenüberstellung der Effekte verschiedener PKC-Inhibitoren auf die Adhäsion humaner Nierenkarzinomzelllinien an Laminin. *, statistisch signifikant im t-Test (zum genaueren Signifikanzniveau vgl. Tab. 5).

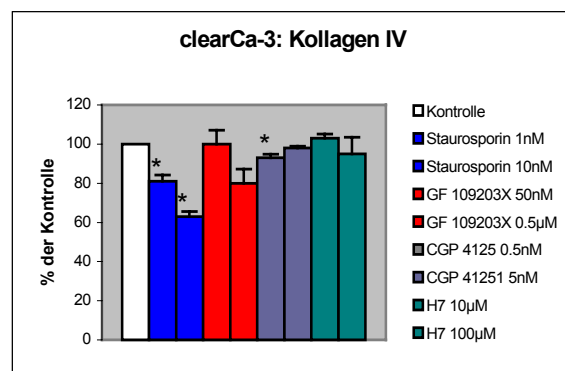
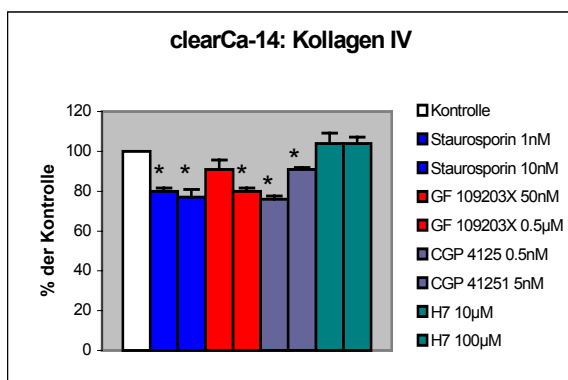
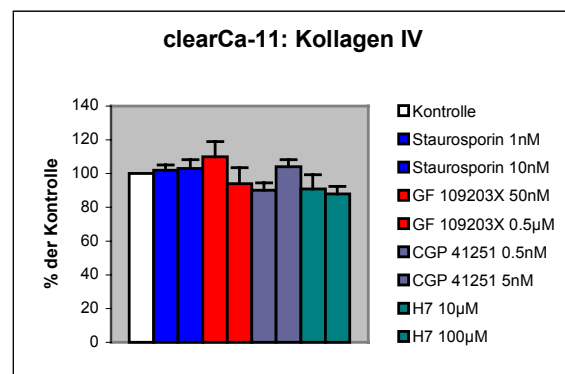
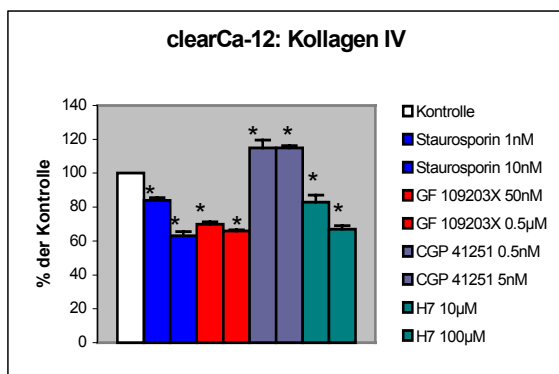
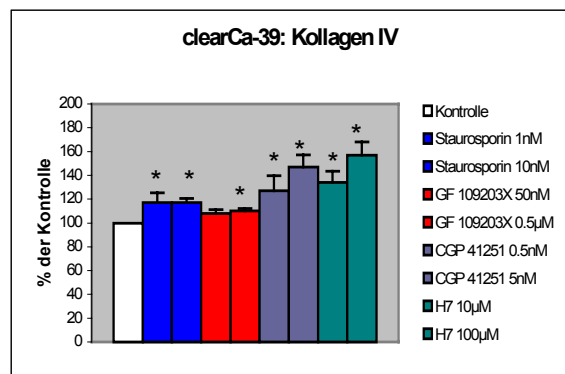
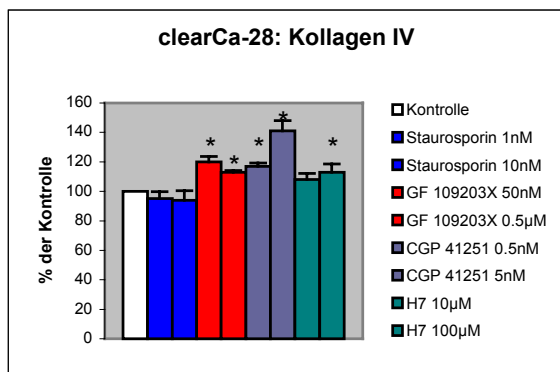
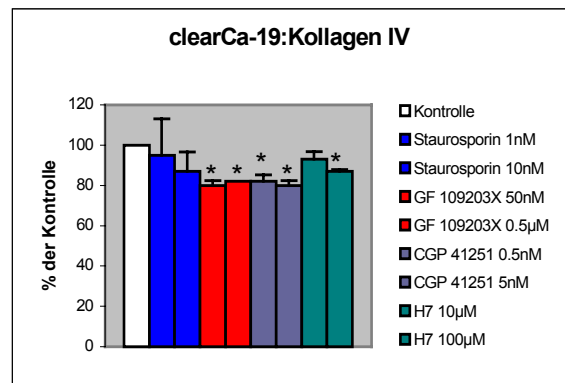
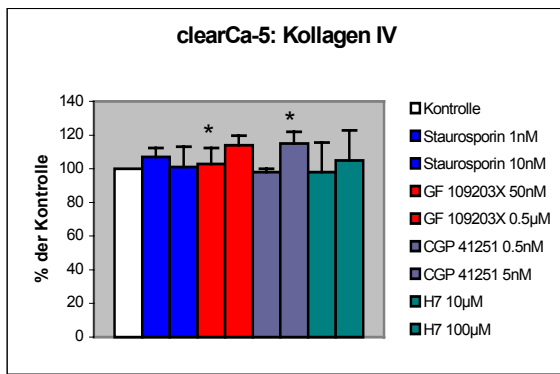


Abb. 6. Vergleichende Gegenüberstellung der Effekte verschiedener PKC-Inhibitoren auf die Adhäsion humaner Nierenkarzinomzelllinien an Kollagen IV. *, statistisch signifikant im t-Test (zum genaueren Signifikanzniveau vgl. Tab. 5).

5.2 Effekte von Inhibitoren der Proteinkinase C auf das Adhäsionsverhalten humaner epitheloider Sarkomzelllinien an verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix

Obgleich es sich bei den Zelllinien GRU-1A, GRU-1B und GRU-1C um klonale Subpopulationen derselben humanen epitheloiden Sarkomzelllinie GRU-1 handelt und alle Klone die fünf PKC-Isoenzyme PKC- α , - ϵ , - ι , - μ und - ζ exprimieren, waren die Effekte der verschiedenen PKC-Inhibitoren auf die Adhäsion an extrazelluläre Matrixkomponenten sehr heterogen (Tab. 7 und Abb. 7). In den Adhäsionsassays der Zelllinie GRU-1A an Fibronectin führten nur die Applikationen von GF 109203X und H7 jeweils zu einem signifikanten Adhäsionsanstieg, während die Adhäsion an Kollagen IV durch die beiden selektiven PKC-Inhibitoren GF 109203X und CGP 41251 gefördert wurde. Das Adhäsionsverhalten der Zelllinie GRU-1A an Laminin wurde hingegen durch keinen der eingesetzten PKC-Inhibitoren nennenswert beeinflusst.

Bei der epitheloiden Sarkomzelllinie GRU-1B führte keiner der PKC-Inhibitoren zu einer nennenswerten Beeinflussung der Adhäsion an Fibronectin und Kollagen IV, während die Adhäsion an Laminin aber durch Staurosporin, H7 und CGP 41251 signifikant inhibiert wurde.

In den Adhäsionsassays der Zelllinie GRU-1C wurde die Adhäsion an Laminin durch Staurosporin gehemmt, durch den selektiveren PKC-Inhibitor CGP 41251 hingegen gesteigert. Die Adhäsion an Fibronectin wurde nur durch H7 signifikant gehemmt. Dagegen führte die Applikation der vier PKC-Inhibitoren in den Adhäsionsassays der GRU-1C an Kollagen IV, ähnlich wie bei GRU-1B, zu keinen signifikanten Effekten.

A

GRU-1A: Fibronektin		GRU-1A: Laminin		GRU-1A: Kollagen IV	
Staurosporin 1nM	101 ± 2	Staurosporin 1nM	100 ± 4	Staurosporin 1nM	108 ± 3 *
Staurosporin 10nM	93 ± 6	Staurosporin 10nM	90 ± 6	Staurosporin 10nM	101 ± 8
GF 109203X 50nM	111 ± 13	GF 109203X 50nM	97 ± 1 *	GF 109203X 50nM	96 ± 2
GF 109203X 0.5µM	121 ± 7 *	GF 109203X 0.5µM	90 ± 5	GF 109203X 0.5µM	110 ± 2 *
CGP 41251 0.5nM	106 ± 6	CGP 41251 0.5nM	99 ± 6	CGP 41251 0.5nM	121 ± 6 *
CGP 41251 5nM	106 ± 3	CGP 41251 5nM	106 ± 3	CGP 41251 5nM	119 ± 6 *
H7 10µM	109 ± 17	H7 10µM	96 ± 9	H7 10µM	92 ± 4
H7 100µM	124 ± 9 *	H7 100µM	96 ± 6	H7 100µM	101 ± 8

B

GRU-1B: Fibronektin		GRU-1B: Laminin		GRU-1B: Kollagen IV	
Staurosporin 1nM	102 ± 6	Staurosporin 1nM	89 ± 1 **	Staurosporin 1nM	104 ± 8
Staurosporin 10nM	109 ± 7	Staurosporin 10nM	82 ± 1 ***	Staurosporin 10nM	108 ± 10
GF 109203X 50nM	120 ± 10	GF 109203X 50nM	95 ± 2	GF 109203X 50nM	100 ± 1
GF 109203X 0.5µM	112 ± 6	GF 109203X 0.5µM	93 ± 6	GF 109203X 0.5µM	89 ± 7
CGP 41251 0.5nM	101 ± 9	CGP 41251 0.5nM	73 ± 8 *	CGP 41251 0.5nM	96 ± 2 *
CGP 41251 5nM	99 ± 4	CGP 41251 5nM	65 ± 5 **	CGP 41251 5nM	95 ± 6
H7 10µM	108 ± 1 *	H7 10µM	79 ± 6 *	H7 10µM	112 ± 8
H7 100µM	94 ± 13	H7 100µM	79 ± 3 **	H7 100µM	115 ± 10

C

GRU-1C: Fibronektin		GRU-1C: Laminin		GRU-1C: Kollagen IV	
Staurosporin 10nM	102 ± 4	Staurosporin 10nM	91 ± 2 **	Staurosporin 10nM	102 ± 5
GF 109203X 0.5µM	103 ± 7	GF 109203X 0.5µM	95 ± 4	GF 109203X 0.5µM	109 ± 9
CGP 41251 5nM	103 ± 2	CGP 41251 5nM	109 ± 2 **	CGP 41251 5nM	105 ± 14
H7 100µM	88 ± 2 **	H7 100µM	102 ± 2	H7 100µM	104 ± 4

D

	EZM-Komponente	Staurosporin	GF 109203X	CGP 41251	H7
GRU-1A	Fibronektin	~	↑	~	↑
	Laminin	~	(↓)	~	~
	Kollagen IV	↑	↑	↑	~
	HUVEC	↓	↓	↓	↓
GRU-1B	Fibronektin	~	~	~	(↑)
	Laminin	↓	~	↓	↓
	Kollagen IV	~	~	(↓)	~
	HUVEC	↑	~	~	~
GRU-1C	Fibronektin	~	~	~	↓
	Laminin	↓	~	↑	~
	Kollagen IV	~	~	~	~

Tab.7. Effekte der PKC-Inhibitoren Staurosporin, GF 109203X, CGP 41251 und H7 auf das Adhäsionsverhalten humaner epitheloider Sarkomzelllinien an verschiedene Substrate der extrazellulären Matrix. A, GRU-1A; B, GRU-1B; C, GRU-1C. Die angegebenen Werte entsprechen Mittelwerten und Standardabweichungen in % im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle, die per definitionem mit 100% angesetzt wurde. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe eines t-Testes: *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$. D, schematische Zusammenstellung der Effekte verschiedener PKC-Inhibitoren auf das Adhäsionsverhalten epitheloider Sarkomzelllinien an Substrate der extrazellulären Matrix (EZM) und Endothelzellen (HUVEC).

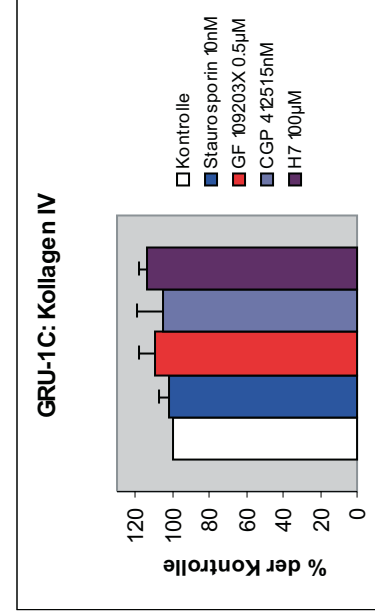
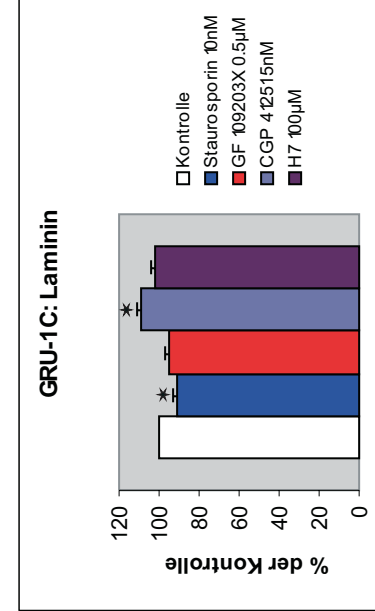
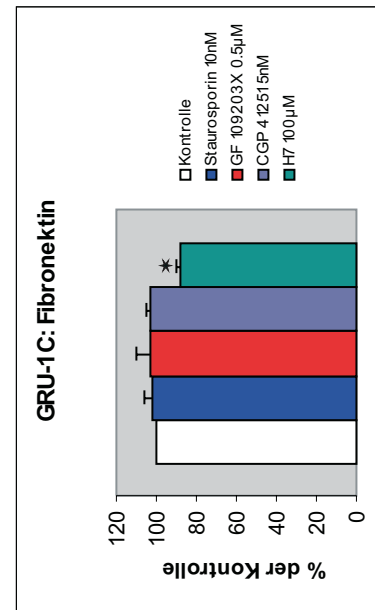
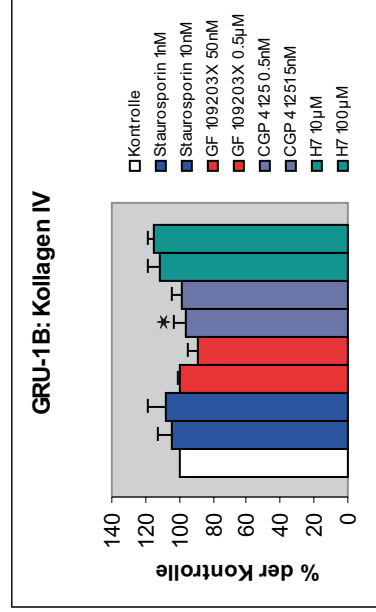
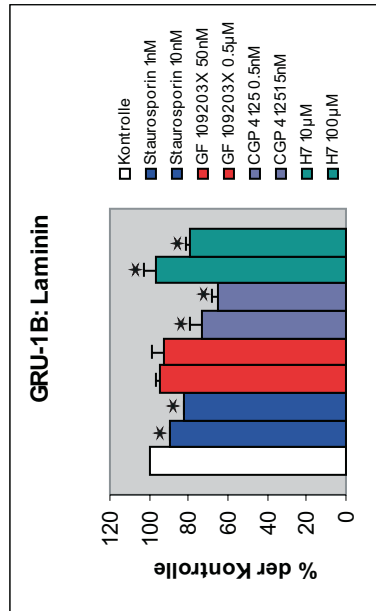
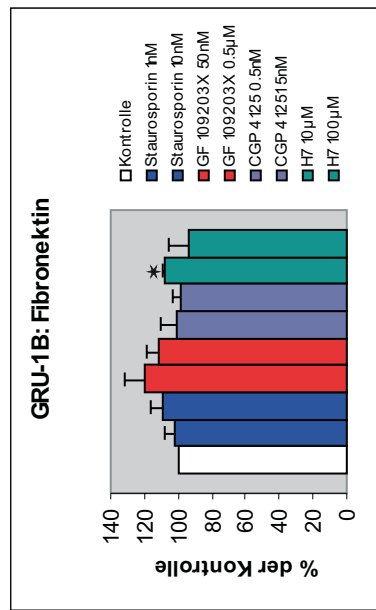
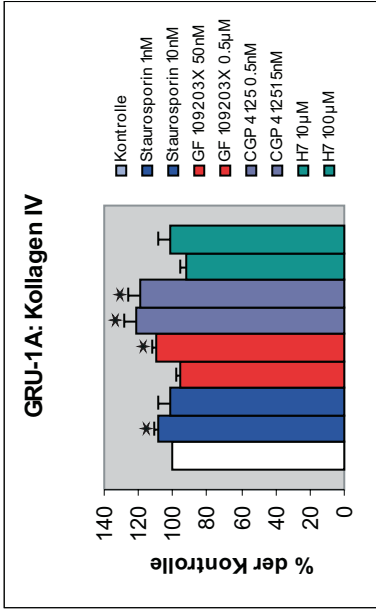
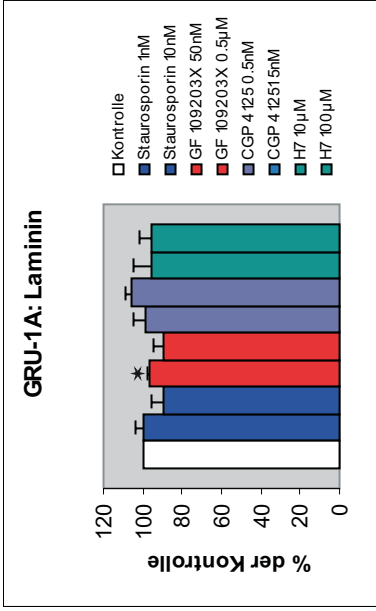
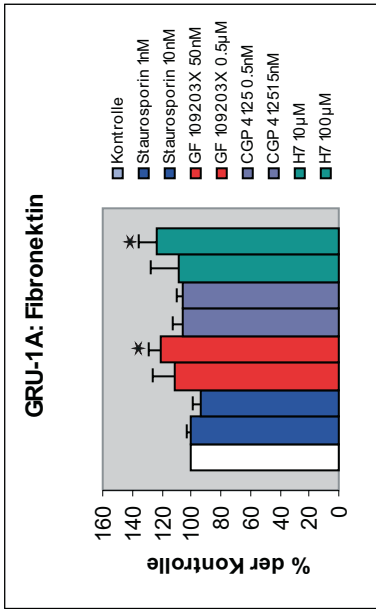


Abb. 7. Vergleichende Gegenüberstellung der Effekte verschiedener PKC-Inhibitoren auf die Adhäsion humaner epitheloider Sarkomzelllinien an verschiedene extrazelluläre Matrixkomponenten. *, statistisch signifikant im t-Test (zum genaueren Signifikanzniveau vgl. Tab. 5).

5.3 Adhäsion stabil transfizierter R6-Zellen an verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix

Um die Funktion bestimmter PKC-Isoenzyme in der Zell-Matrix-Interaktion untersuchen zu können, wurden Adhäsionsassays mit stabil transfizierten R6-Zellen durchgeführt, die bereits aus der Literatur bekannt sind (Borner et al., 1995; Cacace et al., 1996, 1998). Dabei zeigten die mit PKC- α bzw. PKC- ζ transfizierten R6-Zellen eine im Vergleich zu den mit leerem Vektor transfizierten Kontrollzellen (R6-vector) deutlich verstärkte Adhäsion an alle drei EZM-Komponenten (Tab. 8 und Abb. 8). Dagegen führte die Überexpression von PKC- ϵ bzw. PKC- θ in R6-Zellen nur für Laminin und Kollagen IV zu einer signifikanten Steigerung der Zell-Substratadhäsion, während die Adhäsion an Fibronektin nicht beeinflusst wurde.

R6-Zelllinie	Fibronektin	Laminin	Kollagen IV
R6-vector	100	100	100
R6- α (alpha)	108 \pm 1**	110 \pm 1**	113 \pm 3*
R6- ζ (zeta)	119 \pm 2**	118 \pm 1**	119 \pm 5*
R6- ϵ (epsilon)	104 \pm 3	107 \pm 1**	110 \pm 3*
R6- θ (theta)	102 \pm 1	104 \pm 1*	104 \pm 1*

Tab. 8. Adhäsion stabil transfizierter R6-Zellen an verschiedene Substrate der extrazellulären Matrix. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe eines t-Testes: *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$.

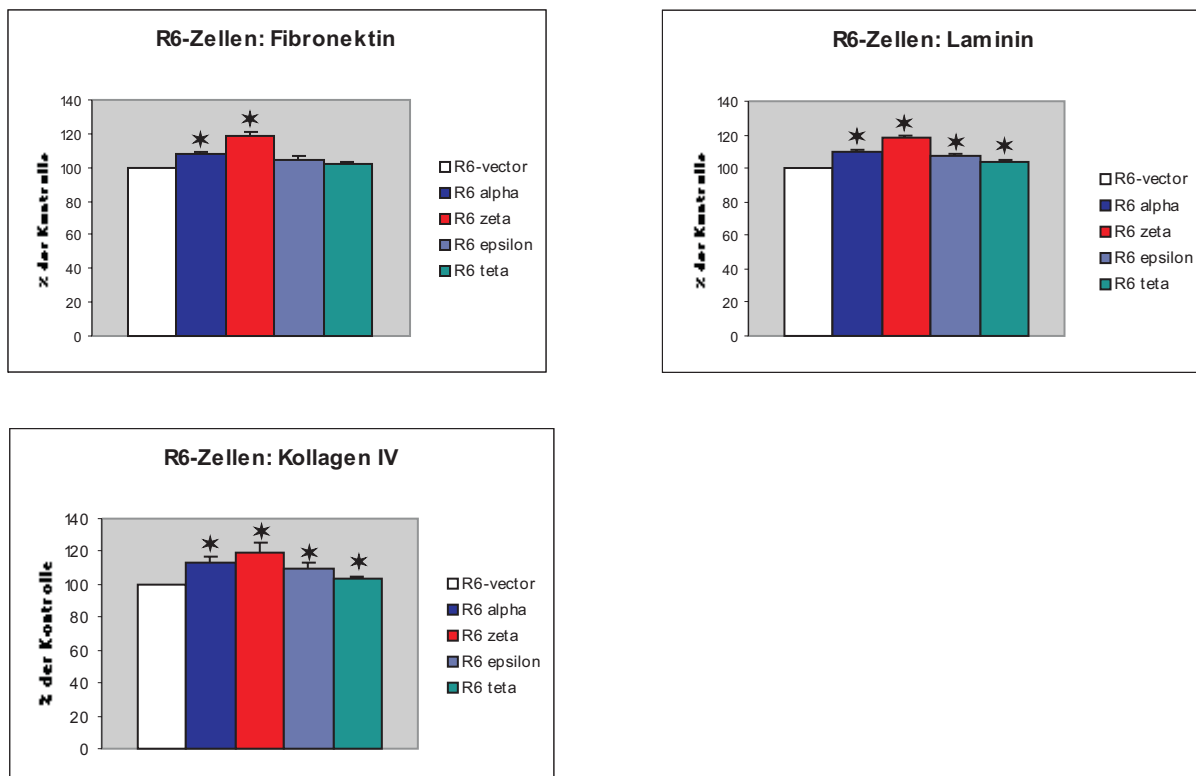


Abb. 8. Vergleichende Gegenüberstellung der Adhäsion verschiedener stabil transfizierter R6-Zellen an humane Endothelzellen. *, statistisch signifikant im t-Test (zum genaueren Signifikanzniveau vgl. Tab. 5).

5.4 Effekte von Inhibitoren der Proteinkinase C auf das Adhäsionsverhalten humaner Nierenkarzinomzelllinien an humane Endothelzellen

Aufgrund bekannter unterschiedlicher PKC-Isoenzymexpressionsmuster (Tab. 2) wurden die humanen Nierenkarzinomzelllinien clearCa-5, -11, -12 und -14 ausgewählt, um die Effekte verschiedener PKC-Inhibitoren auf die Adhäsion an humane Endothelzellmonolayer zu untersuchen (Tab. 9 und Abb. 9). Dabei wurde das Adhäsionsverhalten der beiden Nierenkarzinomzelllinien clearCa-11 und -14 an Endothelzellen durch keinen der vier PKC-Inhibitoren nennenswert beeinflusst. Für die beiden anderen Zelllinien, clearCa-5 und -12, fanden sich jedoch ähnliche Effekte wie bei der Analyse ihrer Interaktion mit der extrazellulären Matrix. Die Adhäsion der Zelllinie clearCa-5 wurde durch die selektiven PKC-Inhibitoren GF 109203X und CGP 41251 signifikant gesteigert, während die Adhäsion der Zelllinie clearCa-12 durch drei der vier PKC-Inhibitoren gehemmt wurde.

	clearCa-5	clearCa-12	clearCa-11	clearCa-14
Staurosporin 10nM	93 ± 6	71 ± 9 *	103 ± 3	95 ± 8
GF 109203X 0.5µM	148 ± 17 *	73 ± 0.2 ***	117 ± 17	98 ± 14
CGP 41251 5nM	133 ± 12 *	78 ± 9	104 ± 14	100 ± 6
H7 50µM	105 ± 7	76 ± 4 *	96 ± 2	86 ± 23

Tab. 9. Effekte verschiedener PKC-Inhibitoren auf das Adhäsionsverhalten humaner Nierenkarzinomzelllinien an humane Endothelzellen. Die angegebenen Werte entsprechen Mittelwerten und Standardabweichungen in % im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle, die per definitionem mit 100% angesetzt wurde. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe eines t-Testes: *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$.

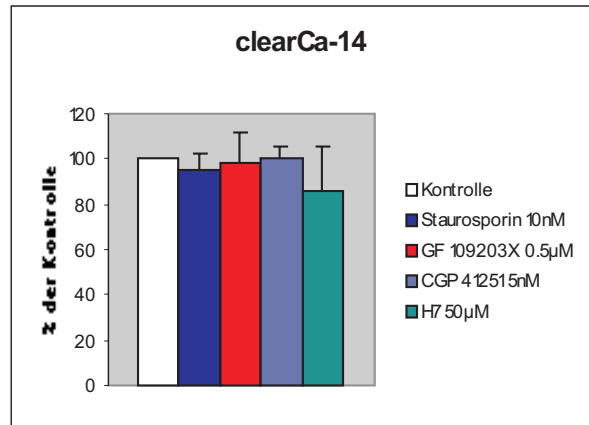
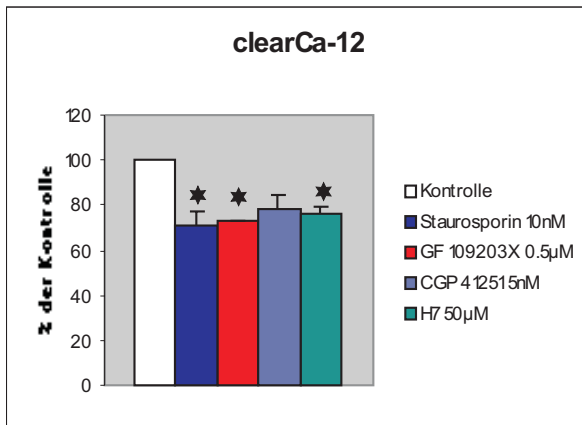
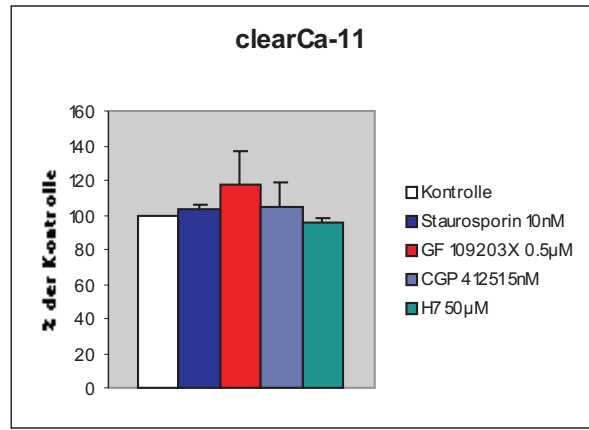
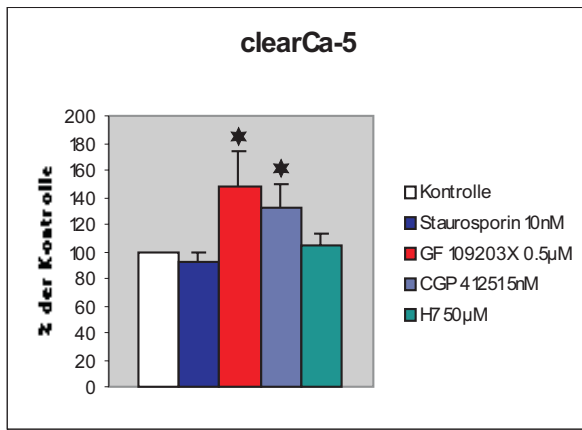


Abb. 9. Vergleichende Gegenüberstellung der Effekte verschiedener PKC-Inhibitoren auf die Adhäsion humaner Nierenkarzinomzelllinien an humane Endothelzellen. *, $p \leq 0,05$.

5.5 Effekte von Inhibitoren der Proteinkinase C auf das Adhäsionsverhalten humaner epitheloider Sarkomzelllinien an humane Endothelzellen

Neben der Zell-Matrix-Interaktion wurden auch für die epitheloiden Sarkomzelllinien GRU-1A und GRU-1B die Effekte der PKC-Inhibitoren auf die Interaktion mit Endothelzellen untersucht (Tab. 10 und Abb. 10). Diese beiden Zelllinien wurden ausgewählt, da sie sich zumindest hinsichtlich ihres Invasionsverhaltens *in vitro* am deutlichsten voneinander unterscheiden (Engers et al., 1999). Die Adhäsion der Zelllinie GRU-1B an humane Endothelzellmonolayer wurde – ähnlich wie die Adhäsion an die extrazellulären Matrixkomponenten Fibronektin und Kollagen IV – durch H7 und die beiden selektiven PKC-Inhibitoren nicht beeinflusst (Tab. 7 und 10). Nur Staurosporin führte zu einem Adhäsionsanstieg auf max. 128% im Vergleich zur Kontrolle (Tab. 10). Im Gegensatz hierzu wurde die Adhäsion der Zelllinie GRU-1A an Endothelzellen durch alle vier PKC-Inhibitoren signifikant inhibiert.

	GRU-1A	GRU-1B
Staurosporin 10nM	67 ± 4 **	128 ± 7 *
GF 109203X 0.5µM	70 ± 4 **	91 ± 9
CGP 41251 5nM	74 ± 8 *	108 ± 9
H7 50µM	76 ± 5 *	100 ± 14

Tab. 10. Effekte verschiedener PKC-Inhibitoren auf das Adhäsionsverhalten humaner epitheloider Sarkomzelllinien an humane Endothelzellen. Die angegebenen Werte entsprechen Mittelwerten und Standardabweichungen in % im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle, die per definitionem mit 100% angesetzt wurde. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe eines t-Testes: *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$.

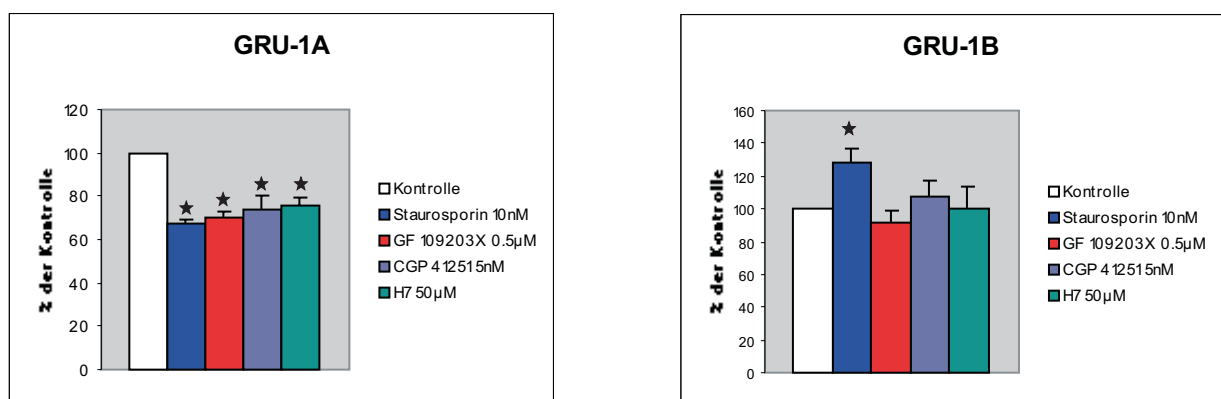


Abb. 10. Vergleichende Gegenüberstellung der Effekte verschiedener PKC-Inhibitoren auf die Adhäsion humaner epitheloider Sarkomzelllinien an humane Endothelzellen. *, $p \leq 0,05$.

6 Diskussion

6.1 Effekte der PKC-Inhibitoren auf die Adhäsion humaner Nierenkarzinomzelllinien an verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix

Die Bedeutung der Proteinkinase C für das biologische Verhalten von Tumoren wurde bisher unter verschiedenen Aspekten wie der Proliferation, Morphologie, Zelldifferenzierung und dem Metastasierungspotential untersucht (Caponigro et al., 1997; Thavasu et al., 1999; Gomez et al., 1999). Die dabei beobachteten Effekte waren jedoch eher tumor- oder sogar zelllinienspezifisch als allgemeingültig. Am Beispiel mehrerer humaner Nierenkarzinomzelllinien konnte unlängst erstmalig gezeigt werden, daß sich das *in vitro*-Invasionsverhalten durch verschiedene Inhibitoren der Proteinkinase C deutlich inhibieren läßt (Engers et al., 2000). Dies deutet darauf hin, daß der Proteinkinase C eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Invasivität humaner Nierenzellkarzinome zukommen könnte.

Ein wichtiger zellbiologischer Schritt bei der Tumorerkrankung ist die Adhäsion von Tumorzellen an Komponenten der extrazellulären Matrix. In der vorliegenden Arbeit wurde daher zunächst mit Hilfe verschiedener PKC-Inhibitoren untersucht, welche Bedeutung der Proteinkinase C für die Regulation der Zell-Substratadhäsion zukommt. Die dabei erzielten Ergebnisse erwiesen sich zwar insgesamt als relativ heterogen, doch konnten auch gewisse homogene Effekte beobachtet werden. Betrachtet man zunächst nur die Zelllinien clearCa-5, clearCa-14, clearCa-19, clearCa-28 und clearCa-39, die die fünf PKC-Isoenzyme PKC- α , - ϵ , - μ , - ι und - ζ exprimierten (Engers et al., 2000 und unveröffentlichte Ergebnisse), so war mit Ausnahme von clearCa-14 unter dem Einfluß der PKC-Inhibitoren vorwiegend eine Adhäsionssteigerung an die extrazelluläre Matrix zu beobachten. Dabei war clearCa-5 jedoch die einzige Nierenkarzinomzelllinie, deren Adhäsion an alle drei ECM-Komponenten durch den spezifischen PKC-Inhibitor GF 109203X ausschließlich gefördert wurde. Den beiden Nierenkarzinomzelllinien clearCa-5 und -19 war der Adhäsionsanstieg an Fibronectin unter allen vier PKC-Inhibitoren gemeinsam. ClearCa-28 und -39 zeigten zwar in Anwesenheit der PKC-Inhibitoren im wesentlichen auch einen Adhäsionsanstieg an Fibronectin, bei der Zelllinie clearCa-28 hemmte aber Staurosporin die Adhäsion, und bei clearCa-39 hatte GF 109203X keinen signifikanten Effekt. Die Zelllinie clearCa-3, die nur vier der oben genannten PKC-Isoenzyme (PKC- α , - ϵ , - μ und - ζ) exprimierte (Engers et al., unveröffentlichte Ergebnisse), zeigte in Anwesenheit dreier verschiedener PKC-Inhibitoren ebenfalls jeweils einen Adhäsionsanstieg an Fibronectin. Dagegen wurde die Adhäsion der Zelllinie clearCa-12 an Fibronectin, die nur die drei PKC-Isoenzyme PKC- α , - ϵ und - ζ exprimierte, durch

verschiedene PKC-Inhibitoren gehemmt. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die Proteinkinase C in die Regulation der Adhäsion humaner Nierenkarzinomzellen an Fibronectin involviert ist, die Art der Effekte aber möglicherweise durch das jeweilige Expressionsmuster der PKC-Isoenzyme in den Zelllinien bestimmt wird.

Die Adhäsion der beiden Nierenkarzinomzelllinien clearCa-28 und -39, wurde in Anwesenheit der PKC-Inhibitoren nicht nur an Fibronectin, sondern auch an Kollagen IV signifikant gesteigert. Für die Zelllinie clearCa-5 galt dies nur in Anwesenheit der beiden selektiven PKC-Inhibitoren. Die beiden übrigen Nierenkarzinomzelllinien clearCa-14 und -19, die dieselben fünf PKC-Isoenzyme exprimierten, zeigten unter dem Einfluß der PKC-Inhibitoren hingegen eine Adhäsionshemmung an Kollagen IV, so daß die Effekte der PKC-Inhibitoren auf die Adhäsion der Nierenkarzinomzelllinien an Kollagen IV eher heterogen ausfielen. Die Effekte der PKC auf das Adhäsionsverhalten der Nierenkarzinomzellen an Kollagen IV sind daher eher als zelllinienspezifisch einzuordnen. Für die PKC wurde eine Beteiligung an der Tumorzelladhäsion an Kollagen IV bereits in anderen publizierten Arbeiten postuliert (Palmantier et al., 1996; Aguirre Ghiso et al., 1997; Quigley et al., 1998). Die Adhäsion einer humanen Mammakarzinomzelllinie an Kollagen IV konnte zum Beispiel durch Aktivierung der PKC-Isoenzyme PKC- ϵ und - μ gesteigert werden (Palmantier et al., 2001).

Während die verschiedenen PKC-Inhibitoren in den Adhäsionsassays an Fibronectin überwiegend zu einem Adhäsionsanstieg führten, waren bezüglich der Adhäsion an Laminin vor allem inhibitorische Effekte zu beobachten. So zeigten drei (clearCa-14, -39 und -28) der fünf Nierenkarzinomzelllinien, die dieselben fünf PKC-Isoenzyme exprimierten, in Anwesenheit der PKC-Inhibitoren GF 109203X, CGP 41251 und H7 eine Adhäsionshemmung an Laminin. Ebenso wurde die Zelllinie clearCa-11, die nur die beiden PKC-Isoenzyme PKC- α und - ζ exprimierte, durch alle vier PKC-Inhibitoren in ihrer Adhäsion an Laminin gehemmt. Eine Adhäsionshemmung an Laminin war auch durch drei der PKC-Inhibitoren bei der Zelllinie clearCa-12 zu beobachten, die PKC- α , - ϵ und - ζ exprimierte, nur CGP 41251 induzierte einen Adhäsionsanstieg. Die unterschiedlichen Effekte der PKC-Inhibitoren hinsichtlich der Adhäsion an Fibronectin und Laminin deuten auf Substrat-spezifische Funktionen der Proteinkinase C hin. Substrat-spezifische Effekte von PKC-Inhibitoren wurden auch von Gimond und Aumailley (1992) beschrieben, die zeigten, daß die beiden PKC-Inhibitoren H7 und Staurosporin die Adhäsion verschiedener Zelllinien an Laminin im Gegensatz zu Fibronectin auf das zwei- bis vierfache steigerten. Für OVCAR-Zellen konnten Gimond et al. (1996) nachweisen, daß das Rearrangement des Zytoskeletts im Anschluß an die Adhäsion an Laminin langsamer erfolgte als an Fibronectin und durch die Applikation von H7 aktiviert wurde. Die Adhäsion einer humanen metastasierenden Melanomzelllinie wurde durch PMA, einem Tumorzellpromotor und Aktivator der Proteinkinase C, zwar an Kollagen I und IV,

nicht aber an Laminin und Fibronectin stimuliert (Dumont und Bitonti, 1994). Interessanterweise waren diese Effekte mit einer gesteigerten Phosphorylierung spezifischer Integrin-Untereinheiten assoziiert, so daß auch die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Substratspezifischen Effekte möglicherweise durch eine selektive Beeinflussung der PKC-vermittelten Phosphorylierung substratspezifischer Integrine erklärt werden könnte. Bei den beiden Nierenkarzinomzelllinien clearCa-5 und -19 war aber im Gegensatz zu den anderen drei Zelllinien, die ebenfalls alle fünf PKC-Isoenzyme exprimierten, unter den PKC-Inhibitoren ein Adhäsionsanstieg an Laminin zu beobachten. Dieser Unterschied beruht möglicherweise auf einer distinkten subzellulären Verteilung und einem damit verbundenen distinkten Aktivitätszustand bestimmter PKC-Isoenzyme, denn PKC- α und PKC- ϵ sind in den Zelllinien clearCa-5 und -19 in einem höheren Ausmaß als bei clearCa-28 und -39 mit der Zellmembran assoziiert, was auf eine Aktivierung dieser Isoenzyme in clearCa-5 und -19 hindeutet (Engers et al., 2000).

Die Nierenkarzinomzelllinie clearCa-12, welche die drei PKC-Isoenzyme PKC- α , - ϵ und - ζ exprimiert, wurde hinsichtlich ihrer Adhäsion an die untersuchten Komponenten der EZM (Fibronectin, Laminin und Kollagen IV) durch Staurosporin, H7 und GF 109203X signifikant gehemmt. Nur CGP 41251 steigerte die Adhäsion an Laminin und Kollagen IV. Diese Inhibitor-spezifischen Effekte könnten darauf beruhen, daß verschiedene Inhibitoren die zytosolischen und membrangebundenen Formen der Proteinkinase C unterschiedlich stark inhibieren. So zeigten Budworth und Gescher (1995) am Beispiel einer Mammakarzinomzelllinie, die nur PKC- ϵ und - ζ sowie in sehr geringer Konzentration auch PKC- α exprimierte, daß CGP 41251 nahezu ausschließlich die zytosolische, Staurosporin hingegen bevorzugt die membrangebundene Proteinkinase C inhibierte. Auch bei allen anderen Nierenkarzinomzelllinien war unter CGP 41251 mit wenigen Ausnahmen ein Adhäsionsanstieg an die extrazelluläre Matrix zu beobachten (Tab. 6). Interessanterweise waren diese signifikanten Effekte zu beobachten, obwohl CGP 41251 nur in einer maximalen Konzentration von 5 nM eingesetzt wurde, während die PKC-Isoenzym-spezifischen IC_{50} -Werte für diesen Inhibitor in der Literatur mit Werten zwischen 21 nM und 500 nM angegeben werden (Tab. 4) (Marte et al, 1994; Geiges et al, 1997; Hofmann et al, 1997). Dies könnte aber darauf hindeuten, daß die in Tab. 4 angegebenen und *in vitro* bestimmten Werte nicht unbedingt auch *in vivo* gelten.

Die Adhäsion der Zelllinien clearCa-3 und clearCa-11 an die extrazelluläre Matrix wurde durch die verschiedenen PKC-Inhibitoren sehr heterogen beeinflusst (Tab. 5 und 6). Die Adhäsion der Zelllinie clearCa-11 an Laminin wurde durch alle PKC-Inhibitoren gehemmt, während die Adhäsion an Fibronectin nur durch Staurosporin inhibiert, durch CGP 41251 und H7 jedoch gesteigert wurde. Diese heterogenen Effekte der PKC-Inhibitoren innerhalb einer Zelllinie und für ein definiertes Substrat wurden auch in anderen Zelltypen beobachtet. So

konnten Gimond und Aumailley (1992) für verschiedene Tumorzelllinien einen zwei- bis vierfachen Adhäsionsanstieg an Fibronectin unter Staurosporin und H7 nachweisen, ohne daß die Adhäsion der RuGli- und Saos-2-Zelllinien an Laminin, Fibronectin und Kollagen IV beeinflußt wurde. Diese Zelllinien- und Substrat-spezifischen Effekte könnten möglicherweise mit der Spezifität der Inhibitoren für bestimmte PKC-Isoenzyme zusammenhängen. So ist bekannt, daß alle PKC-Inhibitoren z. T. erhebliche Unterschiede in der selektiven Inhibition einzelner PKC-Isoenzyme aufweisen (Tab. 4). Die Beobachtung, daß Staurosporin in einem Teil der hier untersuchten Tumorzelllinien im Gegensatz zu den anderen drei PKC-Inhibitoren keine signifikanten Effekte erzielte, vor allem an Laminin und Kollagen IV, spricht möglicherweise dafür, daß hier ganz bestimmte PKC-Isoenzyme in die Adhäsionsprozesse involviert sind. Schließlich ist bekannt, daß Staurosporin gegenüber bestimmten PKC-Isoenzymen wie PKC- δ , - ϵ , - μ , - ζ eine vergleichsweise nur geringe inhibitorische Funktion besitzt (Tab. 4) (Toullec et al, 1991; Geiges et al, 1997; Hofmann et al, 1997). Staurosporin hemmte die Adhäsion der Nierenkarzinomzelllinien clearCa-3 an Laminin und Kollagen IV, clearCa-11 an Fibronectin und Laminin, clearCa-12 an alle drei untersuchten extrazelluläre Matrixkomponenten, clearCa-14 an Kollagen IV und clearCa-28 an Fibronectin. Inhibitorische Effekte durch Staurosporin auf das biologische Verhalten von Tumoren wurden auch in anderen Arbeiten beobachtet (Baltuch et al., 1993; Young et al., 1994; Budworth und Gescher, 1995). Dagegen deuteten Untersuchungen von Stanwell et al. (1996) darauf hin, daß Staurosporin die Zelldifferenzierung in neoplastischen Keratinozyten der Maus *in vitro* paradoxerweise über eine Aktivierung der Proteinkinase C induzieren kann. Interessanterweise beobachteten wir für Staurosporin, einen der wirksamsten PKC-Inhibitoren, bei einzelnen Nierenkarzinomzelllinien einen Adhäsionsanstieg an bestimmte Substrate der extrazellulären Matrix (clearCa-5 an Fibronectin, clearCa-14 an Fibronectin, clearCa-19 an Fibronectin und Laminin sowie clearCa-39 an Fibronectin und Kollagen IV). Darüber hinaus ist bekannt, daß Staurosporin zu einer subzellulären Umverteilung bestimmter PKC-Isoenzyme führen kann (Courage et al., 1995), was in Abhängigkeit von dem in einer Zelllinie vorhandenem PKC-Isoenzymmuster einen Zelllinien-spezifischen Effekt auf die Adhäsion erklären könnte. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit besteht in der relativ geringeren Spezifität des Staurosporins. Man könnte daher mutmaßen, daß die Hemmung anderer Enzyme für die beobachteten Effekte verantwortlich ist. Da aber die durch Staurosporin erzielten Effekte fast immer auch durch mindestens einen selektiven PKC-Inhibitor induziert wurden, kann davon ausgegangen werden, daß die Effekte von Staurosporin überwiegend auf einer Beeinflussung der Proteinkinase C beruhen.

Von allen untersuchten Nierenkarzinomzelllinien wurde die Adhäsion der Zelllinie clearCa-3 in Anwesenheit der vier PKC-Inhibitoren am wenigsten stark beeinflußt (Tab. 5 und 6). CGP 41251 erzielte zwar signifikante, aber heterogene Effekte auf die Adhäsion an Fibronectin

und Kollagen IV, und GF 109203X steigerte nur in der höheren Konzentration die Adhäsion an Fibronectin und Laminin.

Die selektiven PKC-Inhibitoren CGP 41251 und GF 109203X zeigten mit wenigen Ausnahmen jeweils ähnliche Effekte auf die Zell-Substratadhäsion, was darauf hindeutet, daß der Proteinkinase C eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Adhäsion humaner Nierenkarzinomzellen an die extrazelluläre Matrix spielt.

6.2 Effekte der PKC-Inhibitoren auf die Adhäsion humaner epitheloider Sarkomzelllinien an verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix

Die wenigen signifikanten Effekte der PKC-Inhibitoren auf die Adhäsion der epitheloiden Sarkomzelllinien GRU-1A, GRU-1B und GRU-1C an die extrazelluläre Matrix waren zelllinienspezifisch. Die Adhäsion der Zelllinie GRU-1A an Fibronectin und Kollagen IV wurde durch einen Teil der untersuchten PKC-Inhibitoren gesteigert, während die Adhäsion an Laminin durch keinen der verwendeten PKC-Inhibitoren nennenswert beeinflusst wurde. Bei der Zelllinie GRU-1B wurde die Adhäsion an Laminin durch drei der untersuchten PKC-Inhibitoren signifikant gehemmt, die Interaktion mit Fibronectin und Kollagen IV jedoch nicht nennenswert beeinflusst. Diese Unterschiede hängen möglicherweise mit der Beobachtung zusammen, daß in GRU-1A und GRU-1B unterschiedliche endogene Laminin-expressionsmuster vorliegen und diese auf Störungen der Lamininsekretion oder Interaktion mit Laminin beruhen (Engers et al., 1994). Darüber hinaus könnten auch zelllinienabhängige Unterschiede in der Expression substratspezifischer Integrine für die Heterogenität der Effekte verantwortlich sein. Eine Charakterisierung dieser Zelllinien hinsichtlich der Integrin-expressionsmuster wurde bislang allerdings noch nicht durchgeführt.

Die Interaktionen der Zelllinie GRU-1C mit der extrazelluläre Matrix wurde kaum und zudem heterogen durch die verschiedenen PKC-Inhibitoren beeinflusst. Interessanterweise löste GF 109203X unter den epitheloiden Sarkomen nur in den Adhäsionsassays der Zelllinie GRU-1A signifikante Effekte aus, was für einen Zelllinien-spezifischen Effekt spricht. Da die drei untersuchten epitheloiden Sarkomzelllinien jeweils dieselben fünf PKC-Isoenzyme exprimierten (Engers et al., unveröffentlichte Ergebnisse), lassen sich die beobachteten Unterschiede nicht durch unterschiedliche Isoenzymexpressionsmuster erklären. Jedoch könnten, ähnlich wie bei den Nierenzellkarzinomen, quantitative Unterschiede in der Expression der PKC-Isoenzyme und eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung von PKC-Isoenzymen vorliegen. Die nur wenigen signifikanten Effekte der PKC-Inhibitoren könnten darauf hinweisen, daß die Proteinkinase C zumindest bei der Regulation der nicht-stimulierten, spontanen Adhäsion epitheloider Sarkome nur eine untergeordnete Rolle spielt. Dagegen sprechen aber

die z.T. sehr deutlichen inhibitorischen Effekte verschiedener Inhibitoren der PKC auf die Adhäsion von GRU-1B an Laminin. Außerdem muß berücksichtigt werden, daß in der vorliegenden Arbeit mit GRU-1A, GRU-1B und GRU-1C drei klonale Subpopulationen derselben Mutterzelllinie und damit desselben Primärtumors untersucht wurden. Inwieweit sich diese Ergebnisse auch auf andere epitheloide Sarkome übertragen lassen, muß daher in weiteren Untersuchungen an anderen Zelllinien geklärt werden.

6.3 Effekte der PKC-Inhibitoren auf die Adhäsion humaner Nierenkarzinomzelllinien und epitheloider Sarkomzelllinien an humane Endothelzellen

Die Tumorzell-Endothelzell(TZ-EZ)-Interaktion wurde bei der Nierenkarzinomzelllinie clearCa-5 durch die PKC-Inhibitoren GF 109203X und CGP 41251 sowie bei der Zelllinie clearCa-12 durch Staurosporin, GF 109203X und H7 jeweils auf die gleiche Weise beeinflusst wie die Tumorzelladhäsion an die extrazelluläre Matrix. Dies spricht dafür, daß die Proteinkinase C zumindest bei diesen Zelllinien sowohl in die Regulation der TZ-EZ-Interaktion als auch in die TZ-EZM-Interaktion involviert ist. Im Gegensatz hierzu wurden die beiden anderen untersuchten Nierenkarzinomzelllinien clearCa-11 und -14 hinsichtlich ihrer Adhäsion an humane Endothelzellen durch die verschiedenen PKC-Inhibitoren nicht signifikant beeinflusst.

Da sich die beiden Zelllinien clearCa-5 und -14 zwar hinsichtlich der PKC-Inhibitor-induzierten Effekte, nicht aber hinsichtlich des PKC-Isoenzym-Expressionsmusters (beide exprimierten PKC- α , - ϵ , - ι , - μ und - ζ) unterscheiden, deuten diese Ergebnisse darauf hin, daß die bloße Expression bestimmter PKC-Isoenzyme für eine Beeinflussung der TZ-EZ-Adhäsion nicht ausreicht, sondern andere Faktoren wie z. B. die Expressionsstärke und die subzelluläre Lokalisation der Isoenzyme von Bedeutung sein dürften (siehe oben). Dies zeigte sich auch am Beispiel der klonalen epitheloiden Sarkomzelllinien GRU-1A und GRU-1B, die sich ebenfalls nicht hinsichtlich ihrer PKC-Isoenzymexpressionsmuster unterscheiden, aber unterschiedliche Effekte nach Inkubation mit verschiedenen PKC-Inhibitoren aufwiesen. So führten alle vier PKC-Inhibitoren zur Hemmung der Adhäsion von GRU-1A an Endothelzellen, während die Adhäsion von GRU-1B an Endothelzellen durch drei der Inhibitoren nicht beeinflusst und durch Staurosporin sogar gesteigert wurde.

Trotz der Heterogenität der Befunde deuten unsere Ergebnisse darauf hin, daß die PKC eine wichtige Rolle bei der Regulation der TZ-EZ-Interaktion spielt. Dies wird unterstützt durch Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die zeigen konnten, daß Thrombin über eine Aktivierung der Proteinkinase C zu einer Hochregulation der β 3-Integrine und konsekutiv zu

einer verstärkten Adhäsion humaner Adenokarzinomzellen des Colons an Endothelzellen führt (Chiang et al., 1996). Darüber hinaus konnten Liu et al. (1992) für eine amelanotische Melanom-Zelllinie nachweisen, daß erhöhte Konzentrationsspiegel der zytosolischen und membrangebundenen Proteinkinase C mit einer verstärkten Adhäsion an Gefäßwandendothelien korrelieren. Außerdem induzierte das in Pankreaskarzinomzellen exprimierte Interleukin IL-1 α eine Hochregulation von E-Selektin, die wiederum über eine Aktivierung der Proteinkinase C zu einer verstärkten Adhäsion der Tumorzellen an humane Endothelzellen führte (Kaji et al., 1995). Theoretisch könnte man mutmaßen, daß die beobachteten Effekte außer auf einer Inhibition der Proteinkinase C in den Tumorzellen auch auf einer Inhibition der Proteinkinase C in den Endothelzellen beruhen. Hinweise für eine Beteiligung der PKC in den Endothelzellen an der TZ-EZ-Interaktion finden sich bereits in vorausgegangen publizierten Untersuchungen. So steigerte TNF- α in Endothelzellen über eine Aktivierung der Proteinkinase C die Adhäsion einer kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinie (Pottratz et al., 1996; Sheski et al., 1999). 12(S)-HETE stimulierte über eine Aktivierung der Proteinkinase C die Expression des Integrins $\alpha v \beta 3$ in Gefäßwandendothelien der Mäuselunge, was zu einer verstärkten Adhäsion einer amelanotischen Melanomzelllinie an die Endothelzellen führte (Tang et al., 1994 und 1995). Allerdings ist es eher unwahrscheinlich, daß die in unseren Versuchen erzielten heterogenen Effekte der PKC-Inhibitoren durch eine Beeinflussung der PKC in den Endothelzellen zustande kommen. Da die PKC-Inhibitoren unabhängig von der untersuchten Tumorzelllinie in den Endothelzellen immer dieselben Effekte auslösen, müßten die Ergebnisse nur in eine Richtung beeinflußt werden. Die PKC-Inhibitoren würden zum Beispiel immer dieselben Adhäsionsmoleküle in den Endothelzellen aktivieren oder inhibieren. Um dies dennoch eingehender zu überprüfen, müßte man in einem weiterführenden Experimenten gezielt die Proteinkinase C der Endothelzellen in einem *in vitro*-Ansatz inhibieren und die Effekte auf die TZ-EZ-Adhäsion untersuchen.

6.4 Adhäsion stabil transfizierter R6-Fibroblasten an Komponenten der extrazellulären Matrix

Um die Bedeutung einzelner PKC-Isoenzyme für die Regulation der Adhäsion an extrazelluläre Matrixkomponenten beurteilen zu können, wurden vier verschiedene R6-Fibroblasten-Zelllinien, die jeweils eine bestimmte Isoform der Proteinkinase C stabil überexprimierten, auf ihre Interaktion mit der extrazellulären Matrix untersucht. Die mit PKC- α und - ζ transfizierten R6-Zelllinien zeigten im Vergleich zu der nur mit leerem Vektor transfizierten Kontrolle, eine verstärkte Adhäsion an die EZM-Komponenten Fibronectin, Kollagen IV und

Laminin, so daß diesen beiden PKC-Isoenzymen wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Zell-Matrix-Interaktion zukommt. Demnach wäre bei einer Hemmung der PKC-Isoenzyme PKC- α und - ζ durch die PKC-Inhibitoren eine Adhäsionshemmung zu erwarten. Für die Nierenkarzinomzelllinie clearCa-11, die nur diese beiden PKC-Isoenzyme (PKC- α und - ζ) exprimierte, trifft diese Schlußfolgerung zumindest bezüglich der Adhäsion an Laminin zu, die durch alle verwendeten PKC-Inhibitoren gehemmt werden konnte. Staurosporin hemmte außerdem die Adhäsion von clearCa-11 an Fibronectin. Diese inhibitorischen Effekte auf die Zell-Substratadhäsion dürften jedoch primär auf einer Inhibition von PKC- α beruhen, da die verwendeten Konzentrationen der PKC-Inhibitoren jeweils deutlich unter den bekannten PKC- ζ -spezifischen IC₅₀-Werten liegen (siehe Tab. 4). Der durch die zwei PKC-Inhibitoren CGP 41251 und H7 induzierte Adhäsionsanstieg von clearCa-11 an Fibronectin könnte möglicherweise auf unterschiedlichen Zelltypen-spezifischen Funktionen der PKC-Isoenzyme oder unterschiedlichen Zelltypen-spezifischen Expressionsmustern adhäsionsrelevanter Substrate der PKC-Isoenzyme beruhen (Schechtman und Mochly-Rosen, 2001). So zeigten Ron und Kazanietz (1999) sowie Parekh et al. (2000) in Übersichtsarbeiten, daß die komplexen Interaktionen der PKC-Isoenzyme mit verschiedenen Proteinen und insbesondere ihren Substraten in unterschiedlichen Zellsystemen für die Heterogenität der durch die PKC induzierten Effekte mitverantwortlich sind. Diesem Aspekt wird auch in der pharmakologischen Forschung Beachtung geschenkt (Watters und Parsons, 1999).

Die mit PKC- ε bzw. PKC- θ transfizierten R6-Zelllinien zeigten nur für Laminin und Kollagen IV eine verstärkte Adhäsion. Interessant ist ein Vergleich dieser Ergebnisse mit denen der Nierenkarzinomzelllinie clearCa-12, welche neben den beiden PKC-Isoenzymen PKC- α und - ζ auch PKC- ε exprimierte. Die Adhäsion dieser Zelllinie an alle drei untersuchten Komponenten der extrazellulären Matrix wurde fast ausnahmslos durch die verschiedenen PKC-Inhibitoren gehemmt. Die Vermutung, daß daher nicht nur PKC- α und - ζ , sondern auch PKC- ε für die Interaktion dieser Tumorzelllinie mit der extrazellulären Matrix von Bedeutung ist, wird durch die Adhäsionsassays der mit PKC- ε transfizierten R6-Zelllinie bestärkt.

Die epitheloiden Sarkomzelllinien GRU-1A, GRU-1B und GRU-1C exprimierten neben den PKC-Isoenzymen PKC- α , - ε und - ζ auch PKC- ι und - μ , so daß die Ergebnisse der mit PKC- α , - ε bzw. - ζ transfizierten R6-Zellen nicht ohne weiteres auf diese drei Zelllinien übertragbar sind. Die Adhäsion der Zelllinie GRU-1B an Laminin wurde zwar durch die PKC-Inhibitoren Staurosporin, CGP 41251 und H7 signifikant gehemmt, die übrigen Ergebnisse fielen aber eher heterogen aus. Die Heterogenität dieser Ergebnisse erklärt sich vermutlich am ehesten über die zelllinien-spezifischen Eigenschaften der PKC-Isoenzyme und ggf. deren Substrate, die auch in anderen Untersuchungen beobachtet wurden (Huang et al., 1993; Ways et al., 1995; Borner et al., 1995; Manni et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, daß die PKC offenbar eine wichtige Rolle bei der Regulation des Adhäsionsverhaltens humaner Nierenzellkarzinome und epitheloider Sarkome sowohl an die EZM als auch an Endothelzellen spielt. Allerdings erweisen sich die beobachteten Effekte zumindest teilweise als heterogen und zelllinien-spezifisch. Weitere Untersuchungen müssen daher zeigen, wie diese Heterogenität zu erklären ist und ob die gezielte Beeinflussung einzelner PKC-Isoenzyme zu homogeneren Effekten führt, die in Zukunft möglicherweise therapeutisch im Sinne einer antiinvasiven bzw. antimetastatischen Therapie nutzbar gemacht werden können.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der Proteinkinase C für die Adhäsion humaner Nierenkarzinomzelllinien und humaner epitheloider Sarkomzelllinien an Substrate der extrazellulären Matrix und an humane Endothelzellen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Proteinkinase C in die Regulation der Zell-Substrat- und der Tumorzell-Endothelzell-Adhäsion involviert ist. Ähnlich wie für andere Zellsysteme beschrieben, erwiesen sich die mit verschiedenen PKC-Inhibitoren erzielten Effekte als überwiegend heterogen und teilweise Zelllinien- und Substrat-spezifisch. Die Ursachen dieser Heterogenität der Effekte sind bislang weitgehend unklar. Nur für einen Teil der Nierenkarzinomzelllinien fand sich zumindest eine gewisse Assoziation zwischen den Effekten der Inhibitoren und dem Expressionsmuster bestimmter PKC-Isoenzyme, während eine solche Assoziation für andere Nierenkarzinomzelllinien und insbesondere für die humanen epitheloiden Sarkomzelllinien nicht nachweisbar war. Die Inhibitor-spezifischen Effekte könnten zumindest teilweise durch eine unterschiedliche Potenz und Selektivität der PKC-Inhibitoren gegenüber bestimmten PKC-Isoenzymen und anderen Enzymen in der Signaltransduktion erklärt werden. Am Beispiel stabil transfizierter R6-Fibroblasten konnte gezeigt werden, daß die PKC-Isoenzyme α und ζ zu einer Steigerung der Adhäsion an Laminin, Fibronectin und Kollagen IV führen, während ε und θ nur die Adhäsion an Laminin und Kollagen IV fördern. Ob diese Ergebnisse unmittelbar auf humane Nierenzellkarzinome und epitheloide Sarkome übertragen werden können, müssen weitere Untersuchungen mit gezielter Aktivierung bzw. gezielter Blockade einzelner Isoenzyme zeigen. Darüber hinaus muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden, inwieweit die Heterogenität der beobachteten Effekte auf quantitativen Unterschieden in der Expression und subzellulären Verteilung bestimmter PKC-Isoenzyme und Isoenzym-spezifischer Substrate beruht.

8 Literaturverzeichnis

- Aguirre Ghiso JA, Farias EF, Alonso DF, Arregui C, Bal de Kier, Joffe E. A phospholipase D and protein kinase C inhibitor blocks the spreading of murine mammary adenocarcinoma cells altering f-actin and beta1-integrin point contact distribution. *Int J Cancer* 1997; 71: 881-890
- Baltuch GH, Couldwell WT, Villemure JG, Yong VW. Protein kinase C inhibitors suppress cell growth in established and low-passge glioma cell lines. A comparison between staurosporine and tamoxifen. *Neurosurgery* 1993; 33: 495-501
- Barret JM, Ernould AP, Ferry G, Genton A, Boutin JA. Integrated system for the screening of the specificity of protein kinase inhibitors. *Biochemical Pharmacology* 1993; 46: 439-448
- Basu A. The potential of Proteinkinase C as a target for anticancer treatment. *Pharmac Ther* 1993; 59: 257-280
- Behn-Krappa A and Newton AC. The hydrophobic phosphorylation motif of conventional protein kinase C is regulated by autophosphorylation. *Curr Biol* 1999; 9: 728-737
- Ben-Ze'ev A. Cytoskeletal and adhesion proteins as tumor suppressors. *Current opinion in Cell Biology* 1997, 9:99-108
- Blood CH, Zetter BR. Laminin regulates a tumor cell chemotaxis receptor through laminin-binding integrin subunit $\alpha 6$. *Cancer Research* 1993; 53: 2661-2666
- Böcker W, Denk H, Heitz, PU. *Pathologie* 2001; Urban & Fischer: 39-42
- Bornancin F, Parker PJ. Phosphorylation of threonine 638 critically controls the dephosphorylation and inactivation of PKC- α . *Current Biology* 1996; 6: 1114-1123
- Bornancin F, Parker PJ. Phosphorylation of PKC- α on serine 657 controls the accumulation of active enzyme and contributes to its phosphatase-resistant state. *J Biol Chem* 1997; 272: 3544-3549
- Borner C, Ueffing M, Jaken S, Parker PJ, Weinstein IB. Two closely related isoforms of protein kinase C produce reciprocal effects on the growth of rat fibroblasts. possible molecular mechanisms. *J Biol Chem* 1995; 270: 78-86
- Budworth J, Gescher A. Differential inhibition of cytosolic and membrane-derived protein kinase C activity by staurosporine and other kinase inhibitors. *FEBS Letters* 1995; 62: 139-142
- Cacace AM, Ueffing M, Philipp A, Han EK, Kolch W, Weinstein I. PKC epsilon function as an oncogene by enhancing activation of the Raf kinase. *Oncogene* 1996; 13: 2517-2526
- Cacace AM, Ueffing M, Han EK, Marme D, Weinstein IB. Overexpression of PKC- ϵ in R6 fibroblasts causes increased production of active TGF- β . *J Cell Physiology* 1998; 175:314-322
- Caponigro F, French RC, Kaye SB. Protein kinase C: a worthwhile target for anticancer drugs. *Anticancer Drugs* 1997; 8: 26-33
- Carey I, Noti JD. Isolation of protein kinase C-alpha-regulated cDNAs associated with breast tumor aggressiveness by differential mRNA display. *Int J Oncol* 1999; 14: 951-956
- Chao D, Zisman A, Pantuck AJ, Gitlitz BJ, Freedland SJ, Said JW, Figlin RA, Belldegrun AS. Collecting duct renal cell carcinoma: clinical study of a rare tumor. *J Urol.* 2002; 167: 71-74
- Chase DR, Enzinger FM. Epithelioid sarcoma: diagnosis, prognostic indicators, and treatment. *American Journal of surgical pathology* 1985; 9: 241-263
- Chiang HS, Yang RS, Huang TF. Thrombin enhances the adhesion and migration of human colon adenocarcinoma cells via increased $\beta 3$ -integrin expression on the tumor cell surface and their inhibition by the snake venom peptide, rhodostomin. *Brit J Cancer* 1996; 73: 902-908
- Choi PM, Tchou-Wong KM, Weinstein IB. Overexpression of protein kinase C in HT29 colon cancer cells causes growth inhibition and tumor suppression. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 4650-4657
- Chou MM, Hou W, Johnson J, Graham LK, Lee MH, Chen CS, Newton AC, Schaffhausen BS, Toker A. Regulation of PKC- ζ by PI 3-kinase and PDK-1. *Current Biology* 1998; 8: 1069-1077
- Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995, 268: 233-238
- Cowell HE, Garrod DR. Activation of protein kinase C modulates cell-cell and cell-substratum adhesion of a human colorectal carcinoma cell line and restores 'normal' epithelial morphology. *Int J Cancer* 1999; 80: 455-464
- Courage C, Budworth J, Gescher A. Comparison of ability of proteinkinase C inhibitors to arrest cell growth and to alter cellular protein kinase C localisation. *Brit J Cancer* (1995) 71: 697-704

- Curran S and Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *J Pathol* 1999; 189: 300-308
- Dekker LV, Parker PJ, Protein kinase C- a question of specificity. *Trends of Biochemical Science* 1994; 3219: 73-77
- Dong L, Stevens JL, Fabbro D, Jaken S. Protein kinase C isozyme expression and down-modulation in growing, quiescent, and transformed renal proximal tubule epithelial cells. *Cell Growth Differ* 1994; 5: 881-890
- Dong L, Chapline C, Mousseau B, Fowler L, Ramsay K, Stevens JL, Jaken S. 35H, a sequence isolated as a PKC binding protein, is a novel member of the adducin family. *J Biol Chem* 1995; 270:25534-25540
- Dumont JA, Jones WD Jr, Bitonti AJ. Inhibition of experimental metastasis and cell adhesion of B16F1 Melanoma cells by inhibitors of protein kinase C. *Cancer Res* 1992; 52: 1195-1200
- Dumont JA, Bitonti AJ. Modulation of human melanoma cell metastasis and adhesion may involve integrin phosphorylation mediated through protein kinase C. *Biochem Biophys Research Commun* 1994; 204: 264-272
- Edwards AS, Faux MC, Scott JD, Newton AC. Carboxyl-terminal phosphorylation regulates the function and subcellular localization of PKC- β II. *J Biol Chem* 1999; 274:6461-6468
- Engers R, Gerharz CD, Moll R, Pohl A, Sarbia M, Gabbert HE. Interclonal heterogeneity in a human epitheloid-sarcoma cell line (Gru-1). *Int. J. Cancer* 1994; 59:548-553
- Engers R, van Roy F, Heymer T, Ramp U, Moll R, Dienst M, Friebe U, Pohl A, Gabbert HE. Growth inhibition in clonal subpopulations of a human epitheloid sarcoma cell line by retinoid acid and tumor necrosis factor alpha. *British Journal of Cancer* 1996;73: 491-498
- Engers R, Gerharz GD, Donner A, Mrzyk S, Krause-Paulus R, Petek O, Gabbert HE. In vitro invasiveness of human epitheloid-sarcoma cell lines: association with cell motility and inverse correlation with the expression of tissue inhibitor of metalloproteinases. *International Journal of Cancer* 1999;80: 406-412
- Engers R, Mrzyk S, Springer E, Fabbro D, Weissberger G, Gerharz CD and Gabbert HE. Protein kinase C in human renal cell carcinomas: role in invasion and differential isoenzyme expression. *Brit J Cancer* 2000; 82: 1063-1069
- Engers R and Gabbert HE. Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications.. *J Cancer Res Clin* 2000; 126: 682-692
- Fagerstrom S, Pahlman S, Gestblom C, Nanberg E. PKC- ϵ is implicated in neurite outgrowth in differentiating human neuroblastoma cells. *Cell Growth Differentiation* 1996; 7: 775-85
- Feng X, Hannun YA. An essential role for autophosphorylation in the dissociation of activated PKC from the plasma membrane. *JBiol Chem* 1998; 273: 26870-26874
- Flaishon L, Lantner F, Hershkoviz R, Levo Y, Shachar I. Low levels of IFN-gamma down-regulate the integrin-dependent adhesion of B cells by activating a pathway that interferes with cytoskeleton rearrangement. *J Biol Chem* 2001; 276: 46701-4676
- Freed E, Gailit J, van der Geer P, Ruoslahti E, Hunter T. A novel integrin β -subunit in a human osteosarcoma cell line and is a substrate for protein kinase C. *EMBO Journal* 1989; 8: 2955-2965
- Fisher C. Epitheloid sarcoma: The spectrum of ultrastructural differentiation in seven immunohistochemically defined cases. *Hum Pathol* 1988; 19: 265-275
- Flug M, Köpf-Maier P. The basement membrane and its involvement in carcinoma cell invasion. *Acta Anat* 1995; 152: 69-84
- Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1982; 6: 655-63.
- Furukawa T, Watanabe M, Kubota T, Kase S, Fujita S, Yamamoto T, Saikawa Y, Kuo TH, Tanino H, Kurihara, N et al. Significance of in vitro attachment of human colon cancers to extracellular matrix proteins in experimental and clinical liver metastases. *J Surg Oncol* 1993; 53: 10-16
- Gao T, Toker A, Newton AC. The carboxyl terminus of protein kinase C provides a switch to regulate its interaction with the phosphoinositide-dependent kinase, PDK-1. *J Biol Chem* 2001; 276: 19588-19596
- Geboers AD, Debruyne FM. Limitations of surgical curability in renal cell carcinoma. *Prog Clin Biol Res* 1992; 378:175-86.
- Geiges D, Meyer T, Marte B, Vanek M, Weissgerber G, Stabel S, Pfeilschifter J, Fabbro D, Huwiler A.; Activation of PKC subtypes α , γ , δ , ϵ , ζ and η by tumor-promoting and nontumor-promoting agents.. *Biochemical Pharmacology* 1997; 53: 865-875
- Gerharz CD, Ramp U, Olert J, Moll R, Storkel S, Marx N, Gabbert HE, Cytomorphological, cytogenetic, and molecular biological characterization of four new human renal carcinoma cell lines of the clear cell type. *Virchows Arch* 1994;424: 403-409

- Gettman MT, Blute ML, Spotts B, Bryant SC, Zincke H. Pathologic staging of renal cell carcinoma: significance of tumor classification with the 1997 TNM staging system. *Cancer* 2001; 91: 354-361
- Gimond C, Aumailley M. Cellular interactions with the extracellular matrix are coupled to diverse transmembrane signaling pathways. *Exp Cell Res* 1992; 203: 365-373
- Gimond C, Mercier I, Weber I, Aumailley M. Adhesion complexes formed by OVCAR-4 cells on laminin 1 differ from those observed on fibronectin. *Cell Adhesion Commun* 1996; 3:527-539
- Goldstein DR, Cacvace AM, Weinstein IB. Overexpression of protein kinase C beta 1 in the SW480 colon cancer cell line causes growth suppression. *Carcinogenesis* 1995; 16: 1121-1126
- Goldstein NS. The current state of renal cell carcinoma grading. *Cancer* 1997; 80: 977-980
- Gomez DE, Skilton G, Alonso DF, Kazanietz MG. The role of protein kinase C and novel phorbol ester receptors in tumor cell invasion and metastasis (Review). *Oncol Rep* 1999; 6: 1363-1370
- Goodnight JA, Mischak H, Kolch W, Mushinski JF. Immunocytochemical localization of eight protein kinase C isoenzymes overexpressed in NIH 3T3 fibroblasts. Isoform-specific association with microfilaments, Golgi, endoplasmic reticulum, and nuclear and cell membranes. *J Biol Chem* 1995; 270: 9991-10001
- Gopalakrishna R, Barsky SH. Tumor promoter-induced membrane-bound protein kinase C regulates hematogenous metastasis. *Proc Nat Acad Sci* 1988;85: 612-616
- Guadagno SN, Borner C, Weinstein IB. Altered regulation of a major substrate of protein kinase C in rat 6 fibroblasts overproducing PKC- β I. *J Biol Chem* 1992; 267: 2697-2707
- Hanania N, Lezenes JR, Castagna M. Tumorigenicity-associated expression of protein kinase C isoforms in rhabdomyosarcoma-derived cells. *FEBS Letters* 1992; 303: 15-18
- Hansen AB, Bouchelouche PN, Giese BN, Andersen CB. Role of protein kinase C during interferon- γ - and phorbol ester-stimulated immunocytochemical expression of ICAM-1 in human renal carcinoma cells. *APMIS* 1993; 101: 437-448
- Hausser A, Storz P, Link G, Stoll H, Liu YC, Altman A, Pfizenmaier K, Johannes FJ. PKC μ is negatively regulated by 14-3-3 signal transduction proteins. *J Biol Chem* 1999; 274: 9258-9264
- Hibbs ML, Jakes S, Stacker SA, Wallace RW, Springer TA. The cytoplasmic domain of the integrin lymphocyte function-associated antigen 1 β -subunit: sites required for binding to intercellular adhesion molecule 1 and the phorbol ester-stimulated phosphorylation site. *J Exp Med* 1991; 174: 1227-1238
- Hofmann J. The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C. *FASEB* 1997; 11: 649-665
- Huang XP, Da Silva C, Fan XT, Castagna M. Characteristics of arachidonic-acid-mediated brain protein kinase C activation: evidence for concentration-dependent heterogeneity. *Biochim Biophys Acta.* 1993; 1175:351-6.
- Hug H and Sarre ThF. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J* 1993; 291: 329-343
- Humphries MJ. Integrin structure: *Biochem Soc Trans* 2000; 28: 311-339
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *The Journal of clinical investigation* 1973; 52: 2745-2756
- Jaken S. PKC-isoenzymes and substrates. *Current opinion in Cell Biology* 1996; 8:168-173
- Jansen AP, Verwiebe EG, Dreckschmidt NE, Wheeler DL, Oberley TD, Verma AK. Protein kinase C-epsilon transgenic mice: a unique model for metastatic squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61:808-12
- Jenq W, Wu SJ, Kefalides NA. Expression of the α_2 -subunit of laminin correlates with increased cell adhesion and metastatic propensity. *Differentiation* 1994; 58: 29-36
- Johannes FJ, Prestle J, Dietrerich S, Oberhagemann P, Link G, Pfizenmaier K. Characterization of activators and inhibitors of protein kinase C μ . *Eur J Biochem* 1995; 227: 303-307
- Kanai N, Fujita Y, Kakuta T, Saito A. The effects of various extracellular matrices on renal cell attachment to polymer surfaces during the development of bioartificial renal tubules. *Art Organs* 1999; 23: 114-118
- Kaji M, Ishikura H, Kishimoto T, Omi M, Ishizu A, Kimura C, Takahashi T, Kato H, Yoshiki T. E-selectin expression induced by pancreas-carcinoma-derived interleukin-1 α results in enhanced adhesion of pancrea-carcinoma cells to endothelial cells. *Int. J Cancer* 1995; 60: 712-717
- Keranen LM, Dutil EM, Newton AC. Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr Biol* 1995; 5:1394-1403
- Khuri FR, Cho Y, Talmage DA. Retinoic acid-induced transition from PKC- β to PKC- α in differentiated F9 cells: correlation with altered regulation of proto-oncogene expression by phorbol esters. *Cell Growth Differentiation* 1996; 7: 595-602
- Kiley SC, Clark KJ, Duddy SK, Welch DR, Jaken S. Increased protein kinase C- δ in mammary tumor cells: relationship to transformation and metastatic progression. *Oncogene* 1999; 18: 6748-57

- Kishimoto A, Mikawa K, Hashimoto K, Yasuda I, Tanaka SI, Tommaga M, Kuroda T, Nishizuka Y. Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calcium-dependent neutral protease (calpain). *J Biol Chem* 1989; 264: 4088-4092
- Kolanus W and Seed B. Integrins and inside-out signal transduction: converging signals from PKC and PIP3. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9:725-731
- Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D. Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects. *Virchows Archiv* 1996; 429:311-322
- La Porta CA, Comolli R. Overexpression of nPKC- δ in BL6 murine melanoma cells enhances TGF- β 1 release into the plasma of metastasized animals. *Melanoma Research* 2000; 10: 527-534
- Lau WK, Cheville JC, Blute ML, Weaver AL, Zincke H. Prognostic features of pathologic stage T1 renal cell carcinoma after radical nephrectomy. *Urology* 2002; 59: 532-537
- Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR., Cohen P, Parker PJ. PKC-isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 1998; 281: 2042-2045
- Lichtner RB, Wiedemuth M, Noeske-Jungblut C, Schirmacher V. Rapid effects of EGF on cytoskeletal structures and adhesive properties of highly metastatic rat mammary adenocarcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* 1993; 11: 113-125
- Liotta LA, Wewer U, Rao NC, Schiffmann E, Stracke M, Guirguis R, Thorgeirsson U, Muschel R, Sobel M. Biochemical mechanisms of tumor invasion and metastasis. *Anticancer Drug Des* 1987; 2: 195-202
- Liu B, Timar J, Howlett J, Diglio CA, Honn KV. Lipoygenase metabolites of arachidonic and linoleic acids modulate the adhesion of tumor cells to endothelium via regulation of protein kinase C. *Cell Regulation* 1991; 2: 1045-1055
- Liu B, Renaud C, Nelson KK, Chen YQ, Bazaz R, Kowynia J, Timar J, Diglio CA, Honn KV. Protein-kinase-C inhibitor calphosin C reduces B16 amelanotic melanoma cell adhesion to endothelium and lung colonization. *Int J Cancer* 1992; 52: 147-152
- Lohi J. Laminin-5 in the progression of carcinomas. *Int J Cancer* 2001; 94: 763-767
- Marte BM, Meyer T, Stabel S, Standke GJ, Jaken S, Fabbro D, Hynes NE. Protein kinase C and mammary cell differentiation: involvement of PKC- α in the induction of β -casein expression. *Cell Growth Differentiation* 1994; 5: 239-247
- Manni A, Buckwalter E, Etindi R, Kunselman S, Rossini A, Mauger D, Dabbs D, Demers L. Induction of a less aggressive breast cancer phenotype by PKC- α and - β overexpression. *Cell Growth Differentiation* 1996; 7: 1187-1198
- Mattila P, Majuri ML, Tiisala S, Renkonen R. Expression of six protein kinase C isotypes in endothelial cells. *Life Sci* 1994; 55: 1253-1260
- McGregor PE Agrawal DK, Edwards JD. Technique for assessment of leukocyte adherence to human umbilical vein endothelial cell monolayers. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 1994; 32: 73-77
- Meyer T, Regenass U, Fabbro D, Alteri E, Rösler J, Müller M, Caravatti G, Matter A., A derivative of Staurosporine (CGP 41251) shows selectivity for protein kinase C inhibition and in vitro anti-proliferative as well as in vivo anti-tumor activity. *Int J Cancer* 1989; 43: 851-856
- Mian BM, Bhadkamkar N, Slaton JW, Pisters PW, Daliani D, Swanson DA, Pisters LL. Prognostic factors and survival of patients with sarcomatoid renal cell carcinoma. *J Urol.* 2002; 167: 65-70
- Miki I, Ishihara N, Otoshi M, Kase H. Simple colorimetric cell-cell adhesion assay using MTT-stained leukemia cells. *J Immunol Methods* 1993; 164: 255-261
- Mischak H, Goodnight JA, Kolch W, Martiny-Baron G, Schächtele C, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Pierce JH, Mushinski JF. Overexpression of protein kinase- δ and - ϵ in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J Biol Chem* 1993; 268: 6090-6096
- Mohr W. Synovialisartropathien, in Remmele, W. *Pathologie 5*, Urban & Schwarzenberg 1997: 443
- Moch H, Gasser T, Amin MB, Torhost J, Sauter G, Mihatsch MJ. Prognostic utility of the recently recommended histologic classification and revised TNM Staging System of renal cell carcinoma. *Cancer* 2000; 89: 604-614.
- Murphy WM, Beckwith JB, Farrow GM. *Atlas of Tumor Pathology. Tumors of the Kidney, Bladder, and related urinary structures*, 1994: 92-131
- Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 1986; 233: 305-312
- Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB Journal* 1995; 9: 484-496

- O'Brian CA, Vogel VG, Singletary SE, Ward NE. Elevated protein kinase C expression in human breast tumor biopsies relative to normal breast tissue. *Cancer Res* 1989;49: 3215-3217
- Ochoa WF, Garcia-Garcia J, Fita I, Corbalan-Garcia S, Verdaguer N, Gomez-Fernandez JC, Structure of the C2 domain from novel protein kinase Cepsilon. A membrane binding model for Ca(2+)-independent C2 domains. *J Mol Biol*. 2001; 31: 837-849
- Ohta T, Tajima H, Yachie A, Yokoyama K, Elnemr A, Fushida S, Kitagawa H, Kayahara M, Nishimura G, Miwa K, Yamamoto M, Tereda T, Ohkuma S. Activated lansoprazole inhibits cancer cell adhesion to extracellular matrix components. *Int J Oncol* 1999; 15: 33-39
- Palmantier R, Roberts JD, Glasgow WC, Eling T, Olden K, Regulation of the adhesion of a human breast carcinoma cell line to type IV collagen and vitronectin: roles for lipooxygenase and protein kinase C. *Cancer Res* 1996; 56: 2206-12.
- Palmantier R, George MD, Akiyama SK, Wolber FM, Olden K, Roberts JD. Cis-polyunsaturated fatty acids stimulate beta1 integrin-mediated adhesion of human breast carcinoma cells to type IV collagen by activating protein kinases C-epsilon and -mu. *Cancer Res*. 2001; 61: 2445-52.
- Parekh DB, Ziegler W, Parker PJ. Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J* 2000; 19: 496-503
- Parise LV, Criss AB, Nannizzi L, Wardell MR. Glycoprotein IIIa is phosphorylated in intact human platelets. *Blood* 1990; 75: 2363-2368
- Park MJ, Park IC, Hur JH, Rhee CH, Choe TB, Yi DH, Hong SI, Lee SH. Protein kinase C activation by phorbol ester increases in vitro invasion through regulation of matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases system in D54 human glioblastoma cells. *Neurosci Lett*. 2000 Sep 1;290(3):201-204
- Perletti GP, Concary P, Brusaferrri S, Marras E, Piccinini F, Tashjian AH Jr. PKC-ε is oncogenic in colon epithelial cells by interaction with the ras signal transduction pathway. *Oncogene* 1998; 160: 3345-3348
- Petersen RO. *Urologic Pathology*. Lippincott, Philadelphia (1992)
- Pottratz ST, Hall TD, Scribner WM, Jayaram HN, Natarajan V. P-selectin-mediated attachment of small cell lung carcinoma to endothelial cells. *Am J Physiol* 1996; 271: 918-923
- Prevostel C, Alvaro V, de Boisvilliers F, Martin A, Jaffiol C, Joubert D. The natural protein kinase C alpha mutant is present in human thyroid neoplasms. *Oncogene* 1995; 11: 669-674
- Quigley RL, Shafer SH, Williams CL. Regulation of integrin-mediated adhesion by muscarinic acetylcholine receptors and protein kinase C in small cell lung carcinoma. *Chest* 1998; 114: 839-46
- Rennecke J, Rehberger PA, Fürstenberger G, Johannes FJ, Stöhr M, Marks F, Richter KH. PKC-μ expression correlates with enhanced keratinocyte proliferation in normal and neoplastic mouse epidermis and in cell culture. *Int J Cancer* 1999; 80: 98-103
- Rigot V, Lehmann M, Andre F, Daemi N, Marvaldi J, Luis J. Integrin ligation and PKC activation are required for migration of colon carcinoma cells. *Journal of cell science* 1998 (111): 3119-3127
- Rodriguez-Pena A and Rozengurt E. Dissappearance of Ca²⁺-sensitive, phospholipid-dependent protein kinase activity in phorbol ester-treated 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 120: 1053-1059
- Ron D and Kazanietz MG. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J* 1999; 13: 1658-1676
- Ross HM, Lewis JJ, Woodruff JM, Brennan-MF. Epitheloid sarcoma: clinical behavior and prognostic factors of survival. *Ann Surg Oncol* 1997; 4: 491-495
- Sauma S, Yan Z, Ohno S, Friedman F. PKC-βI and PKC-βII activate p57 mitogen-activated protein kinase and block differentiation in colon carcinoma cells. *Cell Growth Diff* 1996; 7: 587-594
- Schechtman D and Mochly-Rosen D. Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. *Oncogene* 2001;20: 6339-47.
- Shafer SH, Puhl HL, Phelps SH, Williams CL. Activation of transfected M1 or M3 muscarinic acetylcholine receptors induces cell-cell adhesion of Chinese hamster ovary cells expressing endogenous cadherins. *Exp Cell Res* 1999; 248: 148-159
- Sharif TR, Sharif M. Overexpression of PKC-ε in astroglial brain tumor derived cell lines and primary tumor samples. *Int. J. Oncology* 1999; 15: 237-43
- Sheski FD, Natarajan V, Pottratz ST. Tumor necrosis factor-alpha stimulates attachment of small cell lung carcinoma to endothelial cells. *J Lab Clin Med* 1999; 133: 265-273
- Siegrist W, Sauter P, Eberle AN. A selective protein kinase C inhibitor (CGP 41251) positively and negatively modulates melanoma cell MSH receptors. *J Recept Signal Tr R* 1995; 15: 283-296
- Sobel ME. Differential expression of the 67kDa laminin receptor in cancer. *Semin Cancer Biol* 1993; 4: 311-317

- Stabel S. The Protein kinase C Family, Growth Factors, Differentiation Factors, and Cytokines. Springer-Verlag, 1990
- Stanwell C, Dlugosz AA, Yuspa SH. Staurosporine induces a complete program of terminal differentiation in neoplastic mouse keratinocytes via activation of PKC. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1259-1265
- Statistisches Landesamt Saarland: Morbidität und Mortalität an bösartigen Neubildungen im Saarland 1991. Sonderhefte 175, 1994
- Störkel S. DNA Image Cytometrie humaner Nierenzelltumore mit dem Leitz Miamed-DNA. *Mitt Wiss Tech* 1989; 6: 214-219
- Störkel S. Tumoren der Niere, 173-192, in: Remmele, W., Pathologie 5, Springer 1997: 174-182
- Störkel S, Eble JN, Adlakha KA, Amin M, Blute ML, Bostwick DG, Darson M, Delahunt B, Iczkowski K. Classification of renal cell carcinoma. *Cancer* 1997; 80: 987-989
- Sossin WS, Schwartz JH. Ca(2+)-independent protein kinase Cs contain an amino-terminal domain similar to the C2 consensus sequence. *Trends Biochem Sci* 1993; 18: 207-208
- Takenaga K and Takahashi K. Effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on adhesiveness and lung-colonizing ability of Lewis lung carcinoma cells. *Cancer Res* 1986; 46: 375-380
- Tang DG, Diglio CA, Honn KV. Activation of microvascular endothelium by eicosanoid 12 (S)-hydroxyeicosatetraenoic acid leads to enhanced tumor cell adhesion via up-regulation of surface expression of $\alpha v \beta 3$ -integrin: a posttranscriptional, protein kinase C- and cytoskeleton-dependent process. *Cancer Res* 1994; 54: 1119-1129
- Tang DG, Diglio CA, Bazaz R, Honn KV. Transcriptional activation of endothelial cell integrin αv by protein kinase C activator 12 (S)-HETE. *J Cell Science* 1995; 108: 2629-2644
- Thavasu P, Propper D, McDonald A, Dobbs N, Ganesan T, Talbot D, Braybrook J, Caponigro F, Hutchison C, Twelves C, Man A, Fabbro D, Harris A, Balkwill F. The protein kinase C inhibitor CGP 41251 suppresses cytokine release and extracellular signal-regulated kinase 2 expression in cancer patients. *Cancer Res* 1999; 59: 3980-3984
- Thoenes W, Störkel S, Rumpelt HJ. Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). *Path Res Pract* 1986; 181: 125-143
- Timar J, Chen YQ, Liu B, Bazaz R, Taylor JD, Honn KV. The lipoxygenase metabolite 12 (S)-HETE promotes $\alpha II \beta III$ integrin-mediated tumor-cell spreading on fibronectin. *Int J Cancer* 1992; 52: 594-603
- Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F, et al. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* 1991; 266: 15771- 15781
- Valmu L, Gahmberg CG. Treatment with okadaic reveals strong threonine phosphorylation of CD18 after activation of CD11/ CD18 leukocyte integrins with phorbol esters or CD3 antibodies. *J Immunol* 1995; 155: 1175-1183
- Watters DJ and Parsons PG. Critical targets of protein kinase C in differentiation of tumor cells. *Biochemical Pharmacology* 1999; 58: 383-388
- Ways DK, Kukoly CA, Devente J, Hooker JL., Bryant WO, Posekany KJ, Fletcher DJ, Cook PP, Parker PJ. MCF-7 breast cancer cells transfected with PKC- α exhibit altered expression of other protein kinase C isoforms and display a more aggressive neoplastic phenotype. *J Clin Invest* 1995; 95:1906-1915
- Weiss SW and Goldblum JR. *Enzinger and Weiss's Soft tissue tumors*. Mosby, St. Louis 2001; 1521-1538
- Wewer UM, Tarabozetti G, Sobel ME, Albrechtsen R, Liotta LA. Role of Laminin receptor in tumor cell migration. *Cancer Research* 1987; 47: 5691-5698
- Wilkinson SE, Parker PJ, Nixon JS. Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C. *Biochem J* 1993; 294: 335-337
- Young CY, Murtha PE, Zhang J. Tumor promoting phorbol ester-induced cell death and gene expression in a human prostate adenocarcinoma cell line. *Oncology Research* 1994; 6: 203-210
- Zhang J, Wang L, Schwartz J, Bond RW, Bishop WR. Phosphorylation of Thr642 is an early event in the processing of newly synthesized PKC- βI and is essential for its activation. *J Biol Chem* 1994; 269: 19578-19584
- Zhou X, Li J, Kucik DF. The microtubule cytoskeleton participates in control of beta2 integrin avidity. *J Biol Chem*. 2001 Nov 30;276(48):44762-44779.

9 Danksagung

Herrn PD Dr. R. Engers danke ich für die Bereitstellung des Promotionsthemas und des Arbeitsplatzes, außerdem für die stets freundliche Betreuung, sein Engagement und die wertvollen Anregungen. Für die geduldige Zusammenarbeit, insbesondere in der Anfangsphase meiner Arbeit, danke ich Frau A. Florenge-Heinrichs und Frau Dr. U. Friebe-Hoffmann. Herrn Dr. D. Fabbro (Basel, Schweiz) verdanke ich die Bereitstellung der stabil transfizierten R6-Zelllinien. Zahlreichen Mitarbeitern des Kreissaals der Universitätsfrauenklinik der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, danke ich für die hilfsbereite Unterstützung bei der Gewinnung der Nabelschnüre. Außerdem gilt mein Dank Frau K. Bodewig und Frau A. Hilwig, die mir in Fragen des Layouts jederzeit hilfsbereite Auskunft gaben.

Lebenslauf

Saida Zoubaa

1971	geboren in Dinslaken, Nordrhein-Westfalen
1981 – 1990	Kopernikus-Gymnasium, Duisburg-Walsum Abschluß: Abitur
1990 – 1996	Studium der Humanmedizin Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
1992	Physikum
1993	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1995	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1995 – 1996	Praktisches Jahr, Städt. Kliniken Neuss-Lukaskrankenhaus Wahlfach Anästhesie
11/1996	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1996 – 1998	AiP am Pathologischen Institut, Abteilung Neuropathologie der Ruprecht Karls-Universität Heidelberg
1998 – dato	wissenschaftliche Angestellte am Pathologischen Institut, Abteilung Neuropathologie

Beruflicher Werdegang:

Facharztausbildung Neuropathologie

1996 – 1999	neuropathologische Weiterbildungszeit
1999 – 2000	neurochirurgische Weiterbildungszeit (Neurochirurgische Klinik der Universität Heidelberg)
2000 – 2002	pathologische Weiterbildungszeit

Heidelberg, 01.09.2003

Erklärung nach §4 Abs. (4) Nrn. 2-4 der Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Ich versichere, daß die der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Bedeutung der Proteinkinase C für die Adhäsion von Tumorzellen an verschiedene Substrate
der extrazellulären Matrix und an Endothelzellen

-eine *in vitro* Untersuchung am Beispiel humaner Nierenkarzinom- und epitheloider
Sarkomzelllinien

ohne unerlaubte Hilfe im Institut für Pathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Anleitung von Herrn PD Dr. med. R. Engers angefertigt wurde.

Ferner versichere ich, daß die vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Heidelberg, 01.09.2003

Bedeutung der Proteinkinase C für die Adhäsion von Tumorzellen an verschiedene Substrate der extrazellulären Matrix und an Endothelzellen
-eine *in vitro* Untersuchung am Beispiel humaner Nierenkarzinom- und epitheloider Sarkomzelllinien

S. Zoubaa

Aus dem Institut für Pathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der Proteinkinase C für die Adhäsion humaner Nierenkarzinomzelllinien und humaner epitheloider Sarkomzelllinien an Substrate der extrazellulären Matrix und an humane Endothelzellen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Proteinkinase C in die Regulation der Zell-Substrat- und der Tumorzell-Endothelzell-Adhäsion involviert ist. Ähnlich wie für andere Zellsysteme beschrieben, erwiesen sich die mit verschiedenen PKC-Inhibitoren erzielten Effekte als überwiegend heterogen und teilweise Zelllinien- und Substrat-spezifisch. Die Ursachen dieser Heterogenität der Effekte sind bislang weitgehend unklar. Nur für einen Teil der Nierenkarzinomzelllinien fand sich zumindest eine gewisse Assoziation zwischen den Effekten der Inhibitoren und dem Expressionsmuster bestimmter PKC-Isoenzyme, während eine solche Assoziation für andere Nierenkarzinomzelllinien und insbesondere für die humanen epitheloiden Sarkomzelllinien nicht nachweisbar war. Die Inhibitor-spezifischen Effekte könnten zumindest teilweise durch eine unterschiedliche Potenz und Selektivität der PKC-Inhibitoren gegenüber bestimmten PKC-Isoenzymen und anderen Enzymen in der Signaltransduktion erklärt werden. Am Beispiel stabil transfizierter R6-Fibroblasten konnte gezeigt werden, daß die PKC-Isoenzyme α und ζ zu einer Steigerung der Adhäsion an Laminin, Fibronectin und Kollagen IV führen, während ϵ und θ nur die Adhäsion an Laminin und Kollagen IV fördern. Ob diese Ergebnisse unmittelbar auf humane Nierenzellkarzinome und epitheloide Sarkome übertragen werden können, müssen weitere Untersuchungen mit gezielter Aktivierung bzw. gezielter Blockade einzelner Isoenzyme zeigen. Darüber hinaus muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden, inwieweit die Heterogenität der beobachteten Effekte auf quantitativen Unterschieden in der Expression und subzellulären Verteilung bestimmter PKC-Isoenzyme und Isoenzym-spezifischer Substrate beruht.

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. R. Engers