



Molekulare Analysen zur Fehlregulation der Apoptose im humanen Nierenzellkarzinom

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ercan Caliskan

aus Izmir, Türkei

Düsseldorf, September 2012

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

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Claus Dieter Gerharz
Korreferent: Prof. Dr. Thomas Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 27. 02. 2013

*meiner Frau Filiz und meiner Tochter Melis
in Liebe und Dankbarkeit
gewidmet*

Während ich glaubte, Leben zu lernen, lernte ich Sterben.
LEONARDO DA VINCI

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	Das humane Nierenzellkarzinom	7
1.2	Tumorentstehung durch Defekte der Apoptose	8
1.3	Ablauf der Apoptose	9
1.4	Caspasen als Vermittler apoptotischer Signale	11
1.5	Signalwege des apoptotischen Selbstmordprogramms	13
1.6	Das TRAIL-System.....	16
1.7	Inhibitoren der Apoptose	22
1.8	Apoptose-Induktion durch Zytostatika und ionisierende Strahlen.....	23
1.9	Modulation von Apoptose über das TRAIL-System in Tumoren.....	30
1.10	Ziel der Arbeit	33
2	Material.....	34
3	Methoden	39
4	Ergebnisse.....	53
4.1	Untersuchungen zur differentiellen Genexpression bei Zytostatika- oder TRAIL-induzierter Apoptose im humanen Nierenzellkarzinom	53
4.1.1	Heterogene Apoptosesensitivität von Nierenkarzinomzelllinien.....	53
4.1.2	Unterschiede im Status der Genexpression in Apoptose-sensitiven und -resistenten Nierenkarzinomzelllinien	56
4.1.2.1	Differentielle Genexpression in der Topotecan-sensitiven Zelllinie clearCa-6.....	60
4.1.2.2	Differentielle Genexpression in der TRAIL-sensitiven Zelllinie clearCa-6	61
4.1.2.3	Differentielle Genexpression in der Topotecan-resistenten Zelllinie clearCa-7	63
4.1.2.4	Differentielle Genexpression in der TRAIL-resistenten Zelllinie clearCa-7	64
4.2	Kombinationswirkung von TRAIL und ionisierender Gamma-Strahlung im humanen Nierenzellkarzinom.....	67
4.2.1	TRAIL-vermittelte Apoptose-Induktion in Nierenkarzinomzelllinien	67
4.2.2	Wirkungssteigerung der TRAIL-induzierten Apoptose durch ionisierende Gamma-Strahlung in Nierenkarzinomzelllinien	68
4.2.3	Regulation der verstärkten Wirkung der TRAIL-induzierten Apoptose durch ionisierende Gamma-Strahlung in Nierenkarzinomzelllinien.....	70

5	Diskussion	74
5.1	Störungen der Apoptoseregulation im humanen Nierenzellkarzinom	74
5.1.1	Identifizierung der potentiell für die Apoptoseresistenz verantwortlichen Gene im humanen Nierenzellkarzinom	74
5.1.2	Kombinationswirkung von TRAIL und ionisierender Gamma-Strahlung	78
6	Zusammenfassung.....	82
7	Summary.....	84
8	Perspektive	86
8	Literaturverzeichnis	87
9	Publikationsverzeichnis	101
10	Vortrags- und Präsentationsverzeichnis.....	101
11	Abbildungsverzeichnis	102
12	Tabellenverzeichnis	103
13	Abkürzungsverzeichnis	104

1 Einleitung

1.1 Das humane Nierenzellkarzinom

Das humane Nierenzellkarzinom ist ein meistens von den Tubuluszellen der Niere ausgehender, maligner Tumor. Es macht etwa 85% der malignen Nierentumoren und etwa 3 bis 4% der malignen Tumoren insgesamt aus (SCHAEFER-PROKOP, 1998; WUNDERLICH et al., 1999). Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 40. und 70. Lebensjahr. Speziell das klarzellige Nierenzellkarzinom tritt größtenteils sporadisch auf, gelegentlich ist jedoch auch eine familiäre Häufung zu beobachten, häufig in Verbindung mit dem Von Hippel-Lindau Syndrom (VHL), bei dem eine inaktivierende Mutation des Tumorsuppressorgens *VHL* vorliegt (NEUMANN et al., 1998).

Im humanen Nierenzellkarzinom werden verschiedene histologische Subtypen unterschieden (THOENES et al., 1986). Mit einem Anteil von etwa 80% stellt das klarzellige Nierenzellkarzinom den häufigsten Subtyp dar; das klare Aussehen der Zellen ist auf eine reichhaltige Ansammlung von Glykogen, Phospholipiden und Neutralfetten zurückzuführen (STÖRKEL, 1999). Das papilläre (chromophile) Nierenzellkarzinom geht häufig mit einer Trisomie der Chromosomen 7, 16 und 17 sowie einem Verlust des Y-Chromosoms einher und macht etwa 10% aller Nierenzellkarzinome aus. Sowohl das klarzellige, als auch papilläre (chromophile) Nierenzellkarzinom leitet sich von den Zellen des proximalen Tubulusepithel ab (KOVACS et al., 1991). Das sich von den Zellen der Sammelrohrschaltstücke ableitende chromophobe Nierenzellkarzinom umfasst ca. 5% aller Nierenzellkarzinome und geht in der Regel mit einem Verlust der Chromosom 1, 2, 6, 10, 13 und/oder 17 einher. Darüber hinaus gibt es noch weitere, sehr seltene Subtypen, die jeweils weniger als 1% aller Nierenzellkarzinome ausmachen, wie beispielsweise das Sammelgangkarzinom (SPEICHER et al., 1994; DECKER & STÖRKEL, 1998). Die Ursachen des Nierenzellkarzinoms sind nicht vollständig geklärt. Als mögliche Risikofaktoren gelten jedoch Rauchen, Fettsucht, Langzeit-Dialyse, erworbene Nierenzysten sowie eine Exposition gegenüber Cadmium und Asbest (HEATH et al., 1997; YUAN et al., 1998a; YUAN et al., 1998b).

Der wichtigste Prognose-limitierende Faktor für das Nierenzellkarzinom ist das Vorliegen einer Fernmetastasierung. Oft liegen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Metastasen in anderen Organen vor. In diesem Stadium ist eine Heilung kaum noch möglich. Das Nierenzellkarzinom metastasiert sowohl lymphogen als auch hämatogen. Zu den häufigsten Metastasenlokalisationen zählen die Lunge, die Lymphknoten, die Leber und das Skelettsystem. Weitere typische, jedoch seltenere Lokalisationen sind die kontralaterale Niere, das Gehirn und das Herz. Da das Nierenzellkarzinom weitgehend resistent gegenüber einer Chemo- und Strahlentherapie ist, besteht bei einem auf die Niere begrenzten Nierenzellkarzinom die Therapie der Wahl in der chirurgischen Entfernung des Tumors bzw. einer radikalen Nephrektomie. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt in diesem Fall 98% (STEINBACH et al., 1992; MOTZER et al., 1997; STAEHLER & BRKOVIC, 1999). Während lokale, auf die Niere begrenzte Tumore durch Tumorenukleation oder radikale Nephrektomie behandelt werden, stellt sich die Therapie bereits metastasierter Nierenzellkarzinome schwieriger dar.

Die systemische Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms wird trotz einer geringen p53-Mutationshäufigkeit durch seine hohe Resistenz gegenüber Chemo- und Strahlentherapiestrategien kompliziert (IARC p53 Database, <http://www-p53.iarc.fr>; WALLACE-BRODEUR & LOWE, 1999; SOUSSI et al., 2000).

Die Ursachen für die Chemotherapieresistenz sind größtenteils unbekannt, man geht aber davon aus, dass diese Resistenz vor allem durch die Expression des *MDR1*-Gens (*Multidrug Resistance*) verursacht wird. Hauptverantwortlich für den *MDR*-Phänotyp im Nierenzellkarzinom ist das p170-Glykoprotein, eine membranständige Effluxpumpe, die in der Lage ist, die intrazelluläre Konzentration der Zytostatika zu verringern, und somit zur Entgiftung der Tumorzelle beiträgt (FOJO et al., 1987). Erste Therapieansätze mit Inhibitoren dieses Proteins waren jedoch enttäuschend und lassen erkennen, dass weitere Mechanismen an der Chemotherapieresistenz des Nierenzellkarzinoms beteiligt sein müssen (HARTMANN & BOKEMEYER, 1999).

Daher ist es dringend nötig, neue Therapiekonzepte für das Nierenzellkarzinom zu entwickeln. Zuvor ist es jedoch erforderlich, die molekularen Mechanismen, die dem biologischen Verhalten des Nierenzellkarzinoms zugrunde liegen, besser zu verstehen. Eine entscheidende Rolle scheinen dabei regulatorische Defekte im Apoptose-Signalweg zu spielen (GERHARZ et al., 1999; DE-JOZEZ et al., 2000; RAMP et al., 2000, 2001, 2003; YAN et al., 2004; HEIKAUS et al., 2007), was im Rahmen der vorliegenden Arbeit - speziell an dem am häufigsten auftretenden klarzelligen Subtyp des Nierenzellkarzinoms (GERHARZ et al., 1993, 1994) - näher untersucht werden sollte.

1.2 Tumorentstehung durch Defekte der Apoptose

Der programmierte Zelltod, auch Apoptose genannt, ist ein physiologischer Prozess, der bei der Entwicklung und Differenzierung von mehrzelligen Organismen von entscheidender biologischer Bedeutung ist. Haben körpereigene Zellen ihre Funktion verloren oder sind fehl entwickelt und drohen damit gefährlich für den Organismus zu werden, werden sie durch diesen Prozess eliminiert (JACOBSON et al., 1997).

Die Apoptose stellt somit das Gegengewicht zur Zellproliferation dar und garantiert damit das Zellgleichgewicht in Geweben, welches für einen regelhaften Entwicklungsprozess des Gesamtorganismus von entscheidender Bedeutung ist (WAGENER, 1999).

Liegen Mutationen oder genetische Anomalien vor, die mit einer Inaktivierung pro-apoptotischer Gene wie z.B. *p53* einhergehen oder zu einer vermehrten Expression anti-apoptotischer Faktoren wie z.B. *Bcl-2*, *XIAP*, *Survivin* oder *c-FLIP* führen, wird dieses physiologische Gleichgewicht durch Inhibierung der Apoptose gestört (VOGELSTEIN et al., 2000; TSUJIMOTO et al., 1985; TAMM et al., 2000; RAMP et al., 2002, 2004; YAN et al., 2004). Eine Reduzierung der Apoptose führt durch die ungehemmte Aktivierung der Zellzyklus-aktivierenden Signalwege z.B. durch die zellulären Proto-Onkogene *Myc* (CORY et al., 1999), *E2F1* (CAM & DYNLACHT, 2003) oder *Ras* und dessen Aktivatoren wie z.B. EGF- oder Her2-/neu-Rezeptor (HINGORANI & TUVESON, 2003) zu einem unkontrollierten Wachstum und fördert hierdurch die Tumorentstehung (THOMPSON, 1995; CARSON & RIBEIRO, 1993).

Hat sich bereits ein Tumor manifestiert, kann eine Störung der Apoptoseregulation zu einer Resistenz des Tumors gegenüber einer Behandlung mit Chemotherapeutika und Bestrahlung führen, da Zytostatika und Bestrahlung durch Induktion apoptotischer Prozesse in der Lage sind einen Tumor zu eliminieren (BARRY et al., 1990; HICKMAN, 1992; LOWE et al., 1993; MÜLLER et al., 1998; BROWN & WOUTERS, 1999; ZHIVOTOVSKY et al., 1999; VERHEIJ & BARTELINK, 2000; LOWE, 2000; Igney & Krammer, 2002; DEBATIN & KRAMMER, 2004; NORBURY & ZHIVOTOVSKY, 2004).

Eine verminderte Apoptosehäufigkeit begünstigt das Überleben und die Akkumulation entarteter Zellen und somit die Entstehung von Tumoren. Eine gesteigerte Apoptosefrequenz hingegen findet sich bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson, ischämischen Herzerkrankungen wie Herzinfarkt und Schlaganfall sowie bei der HIV-induzierten AIDS-Krankheit. (CARSON & RIBEIRO, 1993; THOMPSON, 1995; HETTS, 1998).

1.3 Ablauf der Apoptose

Im menschlichen Organismus sterben jeden Tag Milliarden von Zellen. Apoptose ist die häufigste Form des eukaryotischen Zelltodes und wurde erstmals 1972 von John Kerr beschrieben (KERR et al., 1972; WILLIAMS et al., 1992; RAFF, 1992; THOMPSON, 1995; JACOBSON et al., 1997; EDINGER & THOMPSON, 2004). Das aus dem Griechischen stammende Wort "Apoptose" bezeichnet das Fallen der Blätter im Herbst und gibt damit einen bildlichen Vergleich für das altruistische Absterben einzelner Zellen zum Wohle des Gesamtorganismus (STEPHAN et al., 2000).

Die Apoptose ist ein aktiv regulierter, physiologischer Prozess, der in jeder Zelle ausgelöst werden kann und während der Evolution hoch konserviert wurde (REED, 1999; ARAVIND et al., 1999). Der Zelltod durch Apoptose ist klar von der alternativen Form des Zelltodes, der Nekrose, abzugrenzen, die durch Einwirkung exogener oder endogener Noxen ausgelöst wird. Ist der Prozess der Apoptose aktiviert wird, kommt es zu charakteristischen morphologischen Veränderungen: die betroffenen Zellen runden sich zunächst ab, schrumpfen und lösen sich vom Zellverband, wobei es zur Bläschenbildung ("blebbing") der intakten Zellmembran kommt. Charakteristisch für die Apoptose sind zudem eine Aufhebung der Membranasymmetrie durch Translokation des Phosphatidylserins von der inneren zur äußeren Seite der Membran sowie eine Kondensation des Chromatins und eine durch Aktivierung von Endonucleasen induzierte Fragmentierung des Zellkerns (VERMES et al., 1995). Schließlich zerfällt die Zelle in kleine membranumschlossene Körperchen, die als "apoptotic bodies" bezeichnet werden. Im Gegensatz zur Apoptose ist die Nekrose durch ein Anschwellen der Zelle charakterisiert. Dies führt zur Zerstörung der Plasmamembran und zur Freisetzung des Zellinhaltes in das umliegende Gewebe. Eine inflammatorische Reaktion (Entzündung) mit Gewebeschädigungen ist die Folge (WAGENER, 1999).

In Abbildung 1.1 sind die morphologischen Veränderungen, die im Verlauf der Apoptose und der Nekrose auftreten, schematisch gegenübergestellt.

Wegbereitend für das Verständnis der Apoptose waren genetische und biochemische Untersuchungen am Nematoden *Caenorhabditis elegans*. Analoge und homologe Gene konnten später auch in anderen Organismen, einschließlich der Säuger, identifiziert werden (HENGARTNER & HORVITZ, 1994; ZOU et al., 1997).

Grundsätzlich lassen sich drei Phasen im Verlauf der Apoptose unterscheiden: In der ersten Phase, der Induktionsphase, wird die Apoptose durch ein Signal, wie z.B. Bindung eines zytotoxischen Liganden (1.5.2), Schädigung der DNA (1.8), Entzug von Wachstumsfaktoren oder fehlende Zellkontakte aktiviert (FRISCH & FRANCIS, 1994). In der darauf folgenden Effektorphase werden die induzierten Stoffwechselprozesse durchlaufen und führen durch die Aktivierung von Proteasen und Nukleasen zum Zelltod. In dieser Phase entwickelt die Zelle die charakteristischen morphologischen Merkmale der Apoptose. In der dritten Phase, der Degradationsphase, werden die Zellreste von Makrophagen oder benachbarten Zellen phagozytiert und schließlich vollständig abgebaut.

Ob ein Stimulus tatsächlich zur Auslösung der Apoptose führt, hängt vom Zustand der Zelle bzw. vom Gleichgewicht einer Vielzahl pro- und anti-apoptotischer Faktoren ab. Ist jedoch der sogenannte "point of no return" überschritten, ist ein Weiterleben der Zelle nicht mehr möglich und die Zelle geht unwiderruflich zugrunde.

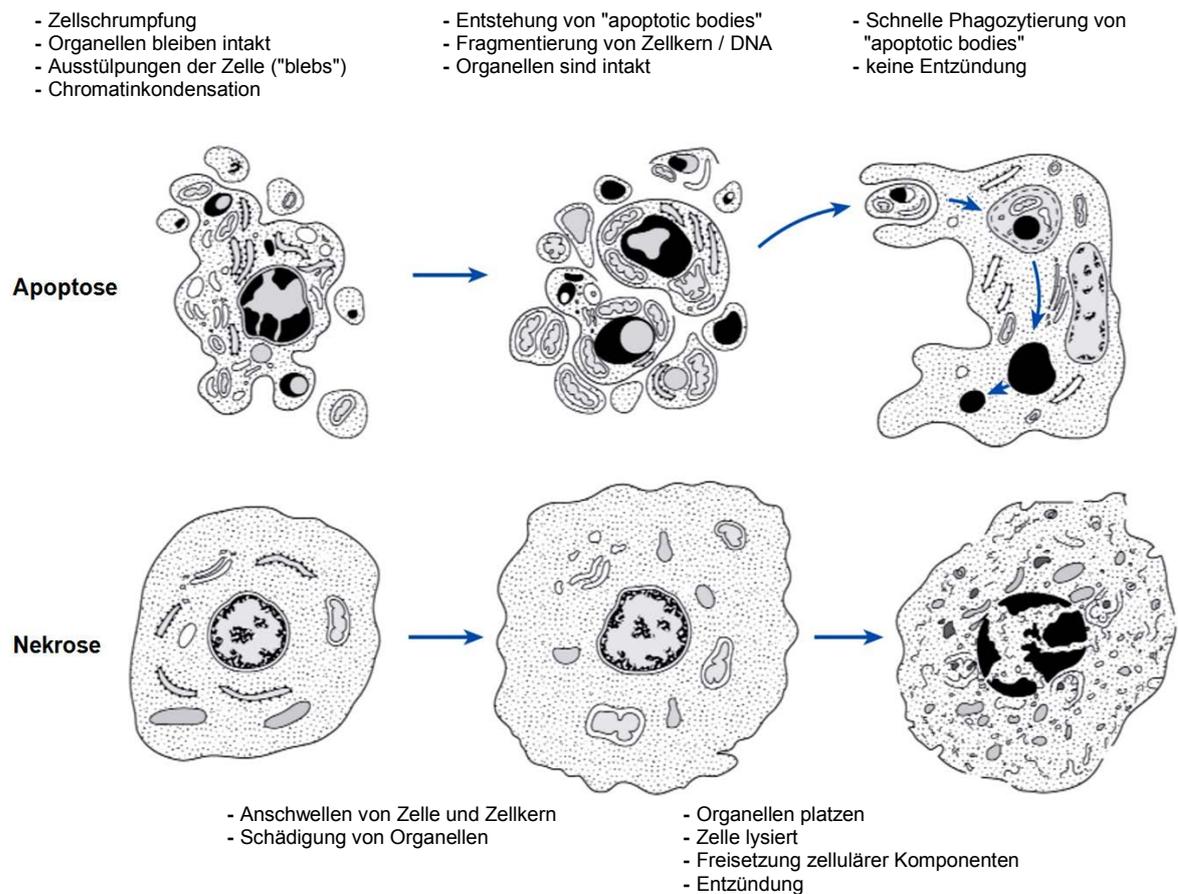


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der morphologischen Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose (Modifiziert nach STELLER, 1995)

1.4 Caspasen als Vermittler apoptotischer Signale

Eine zentrale Rolle sowohl im extrinsischen als auch im intrinsischen Apoptose-Signalweg spielen die Caspasen, eine Familie von intrazellulären Proteasen, die auch als Effektormoleküle der Apoptose bezeichnet werden (Abb. 1.2). Der Name "Caspase" leitet sich von ihrer Wirkungsweise ab: Caspasen gehören der übergeordneten Gruppe der Cystein-Proteasen an und spalten ihre Substrate nach einem Aspartatrest in der Polypeptidkette (Cystein-Aspartat-Protease). Die Protease ICE (Interleukin-1 β -Converting Enzyme, Caspase-1) war die erste Caspase, die in humanen Zellen entdeckt wurde. Eine direkte Beteiligung der Caspasen an der Apoptose konnte jedoch erstmalig durch Untersuchungen an *C. elegans* belegt werden (YUAN et al., 1993).

Bislang konnten Spezies-übergreifend 14 Caspasen - davon 11 im menschlichen Genom - identifiziert werden, wobei 7 eine entscheidende Rolle im Apoptose-Signalweg spielen (EARNSHAW et al., 1999) (Abb. 1.2a). Caspasen werden als Zymogene (Abb. 1.2b), d.h. als inaktive Vorstufen des aktiven Enzyms, synthetisiert. Die inaktiven Pro-Enzyme werden auch als Pro-Caspasen bezeichnet. Sie bestehen aus einer N-terminalen Pro-Domäne, der in der Peptidsequenz eine große (ca. 20 KDa) und eine kleine (ca. 10 KDa) Untereinheit folgen, die über kurze Linker-Peptide miteinander verbunden sind. Eine Aktivierung der Caspasen erfolgt durch die Abspaltung der Pro-Domäne, die proteolytische Spaltung zwischen den beiden Untereinheiten sowie die anschließende Assoziation der kleinen und der großen Untereinheit zu einem Heterodimer. Anschließend formen zwei solche Heterodimere ein Tetramer mit zwei katalytischen Zentren an gegenüberliegenden Seiten des Enzyms und bilden die katalytisch aktive Einheit von Caspase in Form eines $\alpha 2\beta 2$ -Heterotetramers (WALKER et al., 1994; WILSON et al., 1994; ROTONDA et al., 1996; RIEDL et al., 2001).

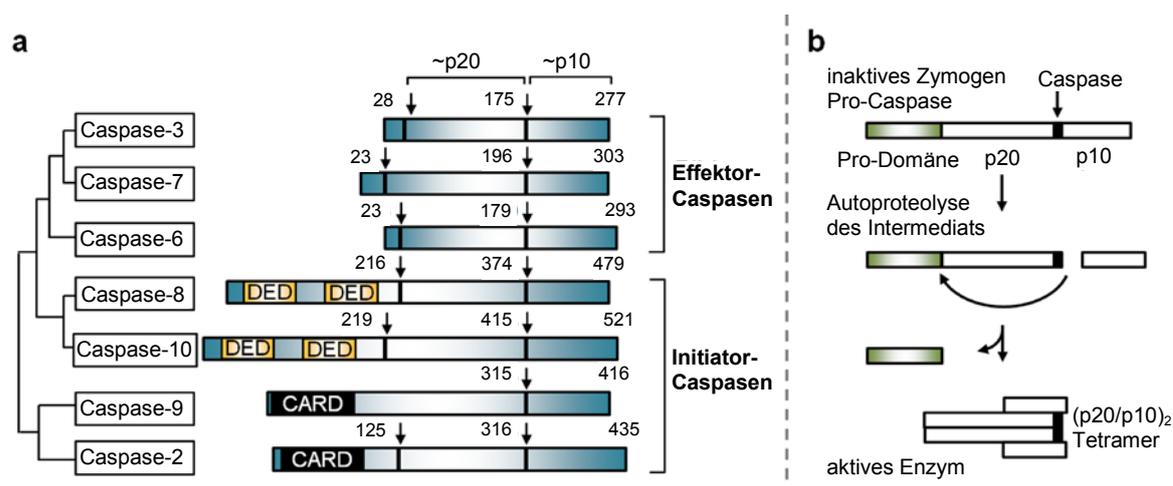


Abb. 1.2: Die Familie der Apoptose-relevanten Caspasen. (a) Schematische Übersichtsdarstellung der Initiator- und Effektor-Caspasen gemäß ihrer aus der Homologie abgeleiteten Verwandtschaft. Die Pro-Domänen innerhalb der Initiator-Caspasen besitzen die für die Proteininteraktion essentiellen Sequenzmotive DED (Death Effector Domain) und CARD (Caspase Recruitment Domain). Pfeile markieren die zur Aktivierung verwendeten Spaltstellen. (b) Übersichtsdarstellung des allgemeinen Aktivierungsprinzips der Effektor-Caspasen. Die Abspaltung der kleinen Untereinheit (p10) durch bereits aktivierte Caspasen führt zur auto-proteolytischen Freisetzung der Pro-Domäne und zur Bildung der aktiven Caspasen, einem Heterotetramer aus jeweils zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten (Modifiziert nach RIEDL & SHI, 2004; WETHKAMP, 2006 [Dissertation])

Die Caspasen können nach Größe ihrer Pro-Domäne in Initiator- und Effektor-Caspasen unterteilt werden (EARNSHAW et al., 1999). Caspasen mit einer langen Pro-Domäne (bis zu 219 Aminosäuren), zu denen Caspase-2, -8, -9 und -10 gehören, sind in die Initiation apoptotischer Vorgänge involviert und werden daher als Initiator-Caspasen bezeichnet. Caspasen mit einer kurzen Pro-Domäne (ca. 20-30 Aminosäuren), zu denen Caspase-3, -6 und -7 zählen, werden als Effektor-Caspasen bezeichnet. Diese sind innerhalb der Caspasen-Kaskade hierarchisch untergeordnet und werden erst durch die aktivierten Initiator-Caspasen aktiviert und prozessiert. In den langen Pro-Domänen der Initiator-Caspasen sind regulatorische Domänen lokalisiert, Caspase-Rekrutierungsdomänen (CARD) im Falle von Caspase-2 und -9 sowie eine Todeseffektordomäne (DED; Death Effector Domain) im Falle der Caspase-8 und -10. Hierüber können die Initiator-Caspasen mit Adaptermolekülen interagieren, die für ihre Aktivierung erforderlich sind (BRAKEBUSCH et al., 1992; CHINNAIYAN et al., 1995; BOLDIN et al., 1995b).

Die Aktivierung der Effektor-Caspasen führt durch proteolytische Spaltung zellulärer Substrate, die beispielsweise an der Aufrechterhaltung der Zellstruktur, der Signaltransduktion oder dem DNA-Metabolismus beteiligt sind, zum Tod der Zelle. In Tabelle 1.1 sind einige der wichtigsten Caspase-Substrate und ihre Funktion innerhalb der Zelle dargestellt. Weitere Substrate sind in der Datenbank "The CASBAH" unter <http://bioinf.gen.tcd.ie/casbah/> frei zugänglich (LUTHI & MARTIN, 2007).

Tab. 1.1: Alphabetische Auflistung verschiedener Caspase-Substrate

SIGNALTRANSDUKTION		DNA-/RNA-METABOLISMUS	ZYTOSKELETT	SONSTIGE FUNKTIONEN
Akt	p49	Acinus	Aktin	APC
APAF-1	p53	ATM	Cortaktin	APP
Bad	PAK2	CAD	Cytokreatin	Ataxin-3/-7
Bcl-2	PKC- δ , - η , - θ	Cdc27	Desmoglein-1	Atrophen-1
Bcl-X_L	PKC- μ	DNA-PKcs	Desmoplaktin	Calpain
Bid	PRK2	Gelsolin	HS1	Calpastatin
Cyclin E	Pro-Caspasen	hnRNPs	Filamin-A/-B	Calsenilin
c-FLIP	Ras-GAP	ICAD	HIP-55	GAL4
c-IAP1	Rb	Lamin	Kinektin	HSF
I- κ B α	RIP-1	PARP	Plakophilin-1	Hsp90
MEKK1	TAF6	Rad9	ROCK-1	Huntingtin
NF- κ B-p50/-p65	TRAF-1/-3	RAD51	Spektrin	Presenilin-1/-2
p21^{CIP1/WAF1}	XIAP	XRCC4	Vinkulin	Tau

Die in dieser Arbeit untersuchten Faktoren sind hervorgehoben. Modifiziert nach LUTHI & MARTIN, 2007

Neben der Caspase-abhängigen Form der Apoptose existiert auch eine Caspase-unabhängige Variante des programmierten Zelltodes, bei der die proteolytische Degradation der Zelle beispielsweise durch lysosomale Proteasen der Cathepsin-Familie initiiert wird. Die Caspasen spielen somit zwar eine zentrale Rolle innerhalb der Apoptose, die Zelle scheint aber zusätzliche, alternative "Sicherheitsmechanismen" entwickelt zu haben, sodass der programmierte Zelltod auch unter Caspase-unabhängigen Bedingungen ablaufen kann (BROKER et al., 2005).

1.5 Signalwege des apoptotischen Selbstmordprogramms

Bei Säugerzellen existieren zwei wesentliche Signalwege der Apoptose, die als extrinsischer und intrinsischer Signalweg bezeichnet werden. Der intrinsische (mitochondriale) Signalweg wird beispielsweise durch Zytostatika, ionisierende Strahlung, DNA-Schädigung oder Aktivierung des Tumorsuppressorgens *p53* induziert und führt zu einer Aktivierung der Mitochondrien mit nachfolgender Induktion der Initiator-Caspase-9 und schließlich zur Aktivierung der Effektor-Caspasen. Der extrinsische (Rezeptor-vermittelte) Signalweg hingegen wird durch die Bindung von zytotoxischen Liganden an sogenannte "Todesrezeptoren" initiiert (RIEDL & SHI, 2004).

1.5.1 Der mitochondriale Signalweg der Apoptose

Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel der Zelle. Darüber hinaus nehmen sie ebenfalls eine bedeutende Funktion innerhalb der Apoptose ein (KROEMER, 1998; ORRENIUS, 2004). Der Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials wird ebenso wie die DNA-Fragmentierung und die Chromatinkondensation als eines der frühesten Anzeichen im Apoptoseprozess beschrieben (PETIT et al., 1995; ZAMZAMI et al., 1995). Die Änderung des Transmembranpotentials entsteht dabei durch die Öffnung eines Porenkomplexes (PTPC, permeability transition pore complex) an der Kontaktseite zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran.

Der PTP-Komplex setzt sich zusammen aus dem Adenin-Nukleotid-Transporter (ANT), dem spannungsabhängigen Anionenkanal (VDAC; Voltage Dependent Anion Channel), der Hexokinase (HK), der Creatinkinase (CK), dem Benzodiazepin-Rezeptor (PBR; Peripheral-type Benzodiazepine Receptor) und Cyclophilin D und bildet dabei die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-pore aus, die unter anderem an der Regulation der Ca^{2+} -Konzentration und des pH-Wertes der mitochondrialen Matrix beteiligt ist (HALESTRAP et al., 2002). Das Öffnen der PT-Pore führt zum irreversiblen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und aufgrund der Hyperosmolarität der mitochondrialen Matrix zu einer Volumenzunahme der Matrix (LY et al., 2003). Eine solche Matrixschwellung führt letztlich zur Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran. Dadurch gelangen im intra-membranären Zwischenraum gelegene pro-apoptotische Faktoren wie Pro-Caspase-2, AIF (Apoptosis Inducing Factor) und Cytochrom c ins Zytoplasma (LIU et al., 1996; SUSIN et al., 1999a; SUSIN et al., 1999b).

Cytochrom c, welches in vitalen Zellen bei der oxidativen Phosphorylierung eine entscheidende Rolle als Elektronencarrier spielt, nimmt auch im Hinblick auf die mitochondriale Apoptose eine zentrale Stellung ein. Cytochrom c bindet in einer ATP-/dATP-abhängigen Reaktion im Zytosol den allosterischen Faktor APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1) und bewirkt dadurch eine Konformationsänderung des Proteins. Durch diese Konformationsänderung wird die Proteinbindedomäne CARD von APAF-1 zugänglich, sodass sie an die CARD-Domäne der Pro-Caspase-9 binden kann (vgl. 1.4). Durch diesen als Apoptosom bezeichneten "Holoenzym"-Komplex wird Caspase-9 aktiviert und nachfolgend über Aktivierung von Effektor-Caspasen die Apoptose initiiert (LI et al., 1997; SLEE et al., 1999; YANG et al., 2001).

1.5.1.1 Die Bcl-2-Familie: Modulatoren der intrinsischen Apoptose

Von besonderer Bedeutung für die Regulation der mitochondrialen Apoptose sind die Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie (B-cell lymphoma-2), von denen mittlerweile über 20 Mitglieder identifiziert werden konnten (WALENSKY, 2006).

Bcl-2 besitzt insgesamt vier verschiedene Bcl-2-homologe Domänen (BH), von denen in allen Bcl-2 Familienmitgliedern mindestens eine vorhanden ist. Die Bcl-2 Familie kann aufgrund von funktionellen Kriterien in Proteine mit anti-apoptotischer und pro-apoptotischer Wirkung unterschieden werden. Die anti-apoptotischen Bcl-2 Mitglieder, zu denen Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w und Mcl-1 gehören, verfügen mindestens über eine BH1- und BH2-Domäne. Die pro-apoptotischen Mitglieder werden in die so genannte "BH3-only"- und in die "Multidomänen" (BH1-3) Gruppen unterteilt. Die apoptotischen Proteine Bak und Bax weisen die BH-Domänen 1 bis 3 auf, während die Gruppe der BH3-only-Proteine, zu welcher die Proteine Bid, Bim, Bad, Bcl-X_S, Puma und Noxa zählen, lediglich durch die Präsenz der BH3-Domäne gekennzeichnet ist (GROSS et al., 1999). Die antagonistischen Faktoren Bcl-X_S und Bcl-X_L werden dabei von demselben Gen kodiert und stellen alternativ gespleißte Isoformen eines Genlocus dar (CHAO & KORSMEYER, 1998).

Einige anti-apoptotische Proteine, wie z.B. Bcl-2 oder Bcl-X_L, verfügen über eine zusätzliche Transmembrandomäne im C-Terminus, mit der sie in der äußeren Mitochondrienmembran, aber auch in der Membran des ER oder Zellkerns verankert sein können (KRAJEWSKI et al., 1993).

Aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten zwischen Bcl-2-Proteinen und verschiedenen Poren-bildenden bakteriellen Toxinen, wie z.B. Diphtheria-Toxin oder Colicin, entwickelte sich die Theorie, dass Mitglieder dieser Proteinfamilie an der Regulation der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran während der Apoptose beteiligt sind (MUCHMORE et al., 1996; MINN et al., 1997). Tatsächlich konnte durch *in vitro* Untersuchungen für Bax, Bcl-2, Bcl-X_L und der prozessierten Form von Bid (tBid; trunkiertes Bid), diese Poren-bildende Aktivität nachgewiesen werden (ANTONSSON et al., 1997; SCHLESINGER et al., 1997; SCHENDEL et al., 1997; SCHENDEL et al., 1998; SCHENDEL et al., 1999).

Nach heutiger Vorstellung führt unter Apoptose-aktivierenden Stimuli eine direkte oder tBid-induzierte Oligomerisierung von Bax und Bak zur Insertion und Ausbildung von Poren in der äußeren mitochondrialen Membran, wodurch pro-apoptotische Faktoren, wie z.B. Cytochrom c, freigesetzt werden. Die Sensitivität einer Zelle gegenüber Apoptose unterliegt dabei dem Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Proteinfamilie, die aufgrund ihrer BH-Domänen interagieren und sich durch Bildung von Homo- und Heterodimeren gegenseitig regulieren können (GROSS et al., 1999).

1.5.2 Der Rezeptor-vermittelte Signalweg der Apoptose

Ein weiterer Mechanismus des apoptotischen Zelltodes, der extrinsische oder Rezeptor-vermittelte Apoptosesignalweg, wird durch Bindung von extrazellulären zytotoxischen Liganden, so genannten Todesliganden, an membranständigen Rezeptoren an der Zelloberfläche induziert.

Zu dieser Gruppe gehören zahlreiche Mitglieder der TNF (Tumour Necrosis Factor)-Rezeptor-Superfamilie. Hierzu zählen beispielsweise TNF-R1 (p55/CD120a), CD95 (Fas/APO-1), die TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 sowie DR3 (TRAMP/APO-3/WSL-1/LARD) und DR6. Aufgrund ihrer Todesdomäne werden diese Rezeptoren auch "Todesrezeptoren" (DR; Death Receptor) genannt (BAKER & REDDY, 1996).

Bei den Todesrezeptoren handelt es sich um Typ-I-Transmembranproteine, die sich alle dadurch auszeichnen, dass ihr extrazellulärer Bereich aus hoch konservierten Cystein-reichen Domänen (CRD) aufgebaut ist, wobei eine CRD jeweils aus 6 Cystein-Resten besteht und die einzelnen Domänen durch 40 Aminosäuren voneinander getrennt sind (SMITH et al., 1993). Darüber hinaus weisen Todesrezeptoren - im Gegensatz zu anderen Vertretern der TNF-Rezeptor-Familie, wie beispielsweise DcR1 und DcR2 - eine aus 80 Aminosäuren zusammengesetzte, N-terminale, intrazelluläre Domäne auf, die es ermöglicht, zytotoxische Signale weiterzuleiten und daher als "Todesdomäne" (DD; Death Domain) bezeichnet wird (TARTAGLIA et al., 1993).

Die Aktivierung der Todesrezeptoren erfolgt durch Bindung der korrespondierenden trimerisierten Liganden (Todesliganden). Hierdurch bilden sich membrangebundene Komplexe aus. Disulfidbrückenbindungen zwischen den Cystein-Resten der CRDs tragen zur Stabilität der Liganden-Rezeptorkomplexe bei (BANNER et al. 1993). Durch Bindung des Liganden wird eine Caspasen-Kaskade induziert, die zur Apoptose dieser Zelle führt (SMITH et al., 1993; CHINNAIYAN et al., 1995).

Neben der Aktivierung von Caspasen kann das Signal der Todesrezeptoren in die proliferations-stimulierenden Signalwege einmünden (vgl. Abb. 1.4): Im TNF-R1-System war es erstmals möglich zu zeigen, dass durch die Vermittlung von TRADD, RIP und TRAF-2 als Adaptermoleküle anstelle einer Aktivierung der Caspasen die Aktivierung des NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) oder der Serin/Threonin-Kinasen JNK/SAPK (c-Jun NH₂-terminalen Kinase/Stress-Aktivierte Proteinkinase) und Akt/PKB (Proteinkinase B) ausgelöst werden kann (FALSCHLEHNER et al., 2007). Diese Faktoren sind an der Regulation von diversen zellulären Prozessen wie Immunantwort, Stress-Adaption, Proliferationskontrolle und Apoptose beteiligt (CHU, 2013; MEYLAN & TSCHOPP, 2005). Jedoch können Zelltyp-spezifisch die korrespondierenden Signalwege miteinander interagieren und somit das zelluläre Gleichgewicht zwischen Überleben und Apoptose bestimmen (GUICCIARDI & GORES, 2009).

Alle Liganden mit Ausnahme von NGF (Nerve Growth Factor) werden der Familie der TNF-Cytokine zugerechnet und weisen im extrazellulären C-Terminus einen ebenfalls hoch konservierten Bereich auf, der mit dem entsprechenden Rezeptor interagiert (GRUSS, 1996). Diese Liganden, zu denen beispielsweise CD95L, TNF α und TRAIL zählen, sind meist Typ-II-Membranproteine. Neben der membrangebundenen Form können sie auch in löslicher Form vorliegen (MARIANI &

KRAMMER, 1998), wenn sie durch spezifische Metalloproteasen aus ihrer membranären Form freigesetzt werden (MCGEEHAN et al., 1994; KAYAGAKI et al., 1995; KIMBERLEY & SCREATION, 2004).

In jüngster Zeit wurde insbesondere dem TRAIL-System eine herausragende Rolle bei der gezielten Induktion des apoptotischen Zelltodes in Tumorzellen zugeschrieben. Ein Schwerpunkt der vorliegenden Untersuchung war daher die Analyse des Apoptose-induzierenden TRAIL-Systems im humanen klarzelligen Nierenzellkarzinom.

1.6 Das TRAIL-System

Der Todesligand TRAIL/Apo2L (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand/Apoptosis 2 Ligand) und seine vier korrespondierenden Rezeptoren sind ein eng mit dem CD95-System verwandtes und ebenfalls zur TNF-Familie gehörendes Regulationssystem der Apoptose, welches im Jahre 1995 identifiziert wurde (SCHAEFER et al., 2007; LEBLANC & ASHKENAZI, 2003).

Im Gegensatz zu CD95L und $TNF\alpha$ weist TRAIL ein sehr breites Expressionsspektrum in vielen normalen und entarteten Zellen auf (WILEY et al., 1995; PITTI et al., 1996; DEGLI-ESPOSTI et al., 1997; WALCZAK et al., 1997).

Humanes TRAIL besteht aus 281 Aminosäuren und wird als Typ-II-Transmembranprotein exprimiert, dessen extrazelluläre Domäne durch Metalloproteasen abgespalten werden kann und dann *in vivo* als aktive lösliche Form vorliegt; diese lösliche Form bildet Homotrimere aus, welche zur Rezeptoraktivierung jeweils drei Rezeptormoleküle zwischen ihren drei Untereinheiten binden (HYMOWITZ et al., 1999). An jeder Untereinheit des trimeren Proteins ist ein Zink-Ion gebunden, welches entscheidend zur Stabilität und somit zur biologischen Aktivität des Liganden beiträgt (HYMOWITZ et al., 2000). Zwei im Menschen entdeckte TRAIL-Spleißvarianten (TRAIL- γ und - β) zeigen ein verringertes Apoptosepotenzial, das auf eine Veränderung der extrazellulären Bindungsdomäne zurückzuführen ist (KRIEG et al., 2003).

Innerhalb der Mitglieder der TNF-Familie hat das TRAIL-System eine Sonderstellung, da es neben den beiden agonistischen Apoptose-induzierenden Todesrezeptoren DR4 (TRAIL-R1/APO-2) und DR5 (TRAIL-R2/TRICK2/KILLER) auch die antagonistischen Apoptose-inhibierende Rezeptoren DcR1 (TRAIL-R3/TRID/LIT) und DcR2 (TRAIL-R4/TRUNDD) umfasst (LEBLANC & ASHKENAZI, 2003; SCHAEFER et al., 2007) (Abb. 1.3).

Die TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 sind strukturell hoch homolog und bestehen aus einem extrazellulären Bereich mit zwei für die Aktivierung essentiellen CRDs, einer transmembranären Region und aus einem intrazellulären Bereich, der die 76 Aminosäuren umfassende Todesdomäne beinhaltet, welche für die Aktivierung des apoptotischen Signalweges notwendig ist. DR5 kann in zwei alternativen Spleißvarianten (TRICK-2A und TRICK-2B) vorliegen, die sich in 23 Aminosäuren zwischen ihrer Transmembrandomäne und dem Beginn der ersten CRD unterscheiden, jedoch funktionell zu keinem Unterschied zu führen scheinen (KIMBERLEY & SCREATION, 2004).

Die Bindung von TRAIL an DR4/DR5-Rezeptoren führt zur Aktivierung ihrer Todesdomänen und löst die Caspasen-abhängige Form des programmierten Zelltodes aus (MCFARLANE et al., 1997, PAN et al., 1997, SCREATON et al., 1997, SHERIDAN et al., 1997, WALCZAK et al., 1997). Jedoch kann dies auch - ebenso wie bei TNF-R1 und CD95 - die Aktivierung eines Signalweges initiieren, der das Überleben der Zelle fördert (siehe 1.5.2).

Die Rezeptoren DcR1 und DcR2 verfügen zwar ebenfalls über eine extrazelluläre TRAIL-Bindungsdomäne mit zwei CRDs, sie besitzen jedoch keine funktionelle Todesdomäne. Während DcR1 überhaupt keine zytoplasmatische Domäne besitzt, verfügt DcR2 lediglich über eine verkürzte zytoplasmatische Domäne, da ihm 52 der 76 Aminosäuren, die die vollständige Todesdomäne kodieren, fehlen. DcR2 ist daher - ebenso wie DcR1 - nicht in der Lage, Apoptose zu initiieren (MCFARLANE et al., 1997, MARSTERS et al., 1997, SHERIDAN et al., 1997; PAN et al., 1997b; PAN et al., 1998). DcR1 und DcR2 werden daher als Decoy(Schein)-Rezeptoren bezeichnet. Von KRIEG et al. (2006) wurde eine neue Spleißvariante des Decoy-Rezeptors DcR2 (TRAIL-R4-β) im Menschen beschrieben. Das Fehlen von Exon 3 des kodierenden Gens führt zur Verkürzung der ersten vollständigen CRD, welche für die TRAIL-Bindung essentiell zu sein scheint (KRIEG et al., 2006).

Mit Osteoprotegerin (OPG) existiert ein weiterer TRAIL-Rezeptor, der im Vergleich zu den gesamten TRAIL-Rezeptoren nur eine geringe Affinität zu TRAIL aufweist und möglicherweise übergeordnet mit der Regulation der Osteoklastenbildung verbunden ist (EMERY et al., 1998).

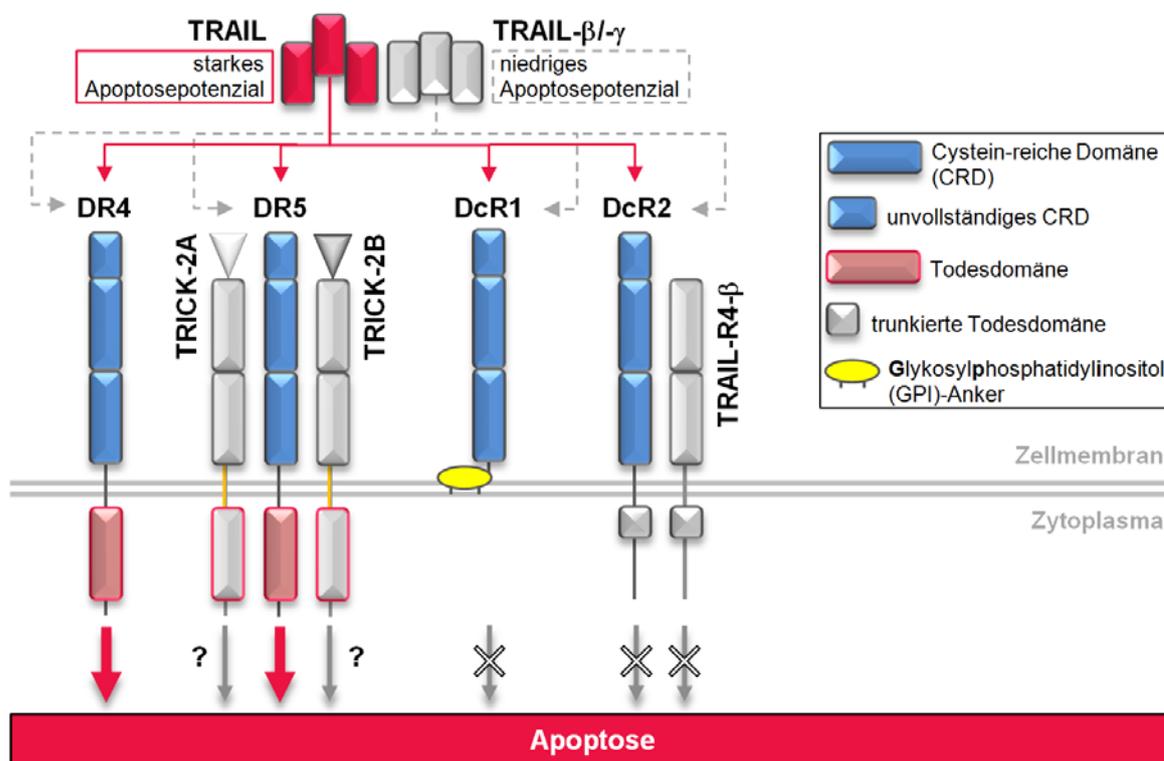


Abb. 1.3: Die Rezeptoren des TRAIL-Systems (Für Erläuterungen siehe Text)

Mögliche Gründe für die einzigartige Komplexität des TRAIL-Rezeptorsystems im Menschen sind bislang noch weitgehend unbekannt. Anfangs wurde vermutet, dies könne die Ursache der selektiven Wirkung von TRAIL an Tumorgewebe unter Aussparung gesunder Zellen sein, da man davon ausging, dass die Decoy-Rezeptoren vermehrt auf gesundem Gewebe ausgebildet seien und dadurch schon rein quantitativ die Wirkung von TRAIL an DR4 und/oder DR5 verringern würden (ALMASAN & ASHKENAZI, 2003). Die ersten Untersuchungen konnten jedoch keine Erklärung für die ubiquitäre Expression der Decoy-Rezeptoren im gesunden Gewebe nachweisen (DANIELS et al., 2005). Ihre Rolle in der Regulation der TRAIL-Antwort wird deshalb als eher gering angesehen und bleibt die Frage nach den Ursachen des vielgestaltigen TRAIL-Rezeptorsystems weiterhin ungeklärt.

1.6.1 Der TRAIL-vermittelte Apoptosesignalweg

Der Verlauf der durch TRAIL vermittelten Apoptose entspricht im Wesentlichen dem einer CD95L-induzierten Apoptose. Die TRAIL-vermittelte Apoptose kann unabhängig über die Todesrezeptoren DR4 oder DR5 induziert werden (WALCZAK & HAAS, 2008). In Zellen, die gleichzeitig DR4 und DR5 exprimieren, kann es zur Bildung von Rezeptor-Heterokomplexen kommen (WAGNER et al., 2007).

Wie in Abbildung 1.4 schematisch dargestellt, erfolgt die DR4- bzw. DR5-Rezeptor-vermittelte Apoptose-Induktion - vergleichbar der CD95-induzierten Apoptose - ebenfalls durch eine Bindung des trimeren TRAIL-Liganden, sie kann jedoch auch durch exogenes rekombinantes humanes und lösliches TRAIL (rhs)-TRAIL (recombinant human soluble) ausgelöst werden.

Die Signalwege der DR4- und DR5-Rezeptor-vermittelten Apoptose-Induktion führen zu einer Trimerisierung oder Multimerisierung des Rezeptors mit nachfolgender Aggregation der Todesdomänen und Rekrutierung des Adaptermoleküls FADD (Fas Associated Death Domain) (GONG & ALMASAN, 2000; YAMANAKA et al., 2000; KISCHKEL et al., 2000; BELKA et al., 2001; NIMMANAPALLI et al., 2001; SULIMAN et al., 2001; SUN et al., 2001; LEBLANC & ASHKENAZI, 2003). Neben der Todesdomäne, über die FADD an die Todesdomäne des Rezeptorkomplexes anknüpft, trägt das Molekül eine Death Effector Domain (DED), die nach Bindung an DR4 und DR5 einer Konformationsänderung unterliegt und dadurch an eine der DEDs von Pro-Caspase-8 und/oder Pro-Caspase-10 binden kann (BODMER et al., 2000; THOMAS et al., 2004). Der hierbei entstehende Signalkomplex wird als DISC (Death Inducing Signalling Complex) bezeichnet (WALCZAK et al., 2006) und führt zur Aktivierung von Caspase-8/10 (SALVESEN & DIXIT, 1999; SCHNEIDER & TSCHOPP, 2000). Während die Pro-Domäne am Rezeptor verbleibt, wird die aktive Caspase-8/10 ins Zytoplasma freigesetzt und bewirkt eine Aktivierung der Effektor-Caspasen -3, -6 und -7 (WALCZAK et al., 2006), die ihrerseits durch die Spaltung diverser zellulärer Substrate, wie z.B. Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), zum eigentlichen Tod der Zelle führen (YANG et al., 2001; WALCZAK et al., 2006). Diese für die Apoptose spezifische Spaltung von PARP wird deshalb für den Nachweis der Apoptose-Induktion verwendet (DURIEZ & SHAH, 1997). Abhängig vom Zelltyp ist auch innerhalb der TRAIL-induzierten Apoptose eine Beteiligung der Mitochondrien möglich. Diese dienen als Verstärker des Apoptosesignals in Zellen, die aufgrund reduzierter DISC-Bildung über

eine geringere Caspase-8-Aktivität verfügen (SCAFFIDI et al., 1998). In den so genannten "Typ-II-Zellen" führt die Caspase-8-abhängige Bid-Spaltung zur Aktivierung der Mitochondrien, wobei die Cytochrom c Freisetzung aus den Mitochondrien die Apoptosombildung initiiert und zur Aktivierung von Caspase-9 führt (BELKA et al., 2001; EGGERT et al., 2001; NIMMANAPALLI et al., 2001; SEOL et al., 2001; SULIMAN et al., 2001; SUN et al., 2001), wodurch schließlich die Aktivierung von Effektor-Caspasen erfolgt (LI et al., 1998; BELKA et al., 2000, 2001; WALCZAK & KRAMMER, 2000; JOSEPH et al., 2002). Die Tatsache, dass in diesen Zellen eine Überexpression von Bcl-2 oder Bcl-X_L zu einer vollständigen Inhibition der Todesrezeptor-abhängigen Apoptose führen kann, zeigt die Bedeutung des mitochondrialen Signalweges im Rahmen der Apoptoseregulation (SCAFFIDI et al., 1998). In "Typ-I-Zellen" hingegen wird die Effektor-Caspase-3 direkt von der Caspase-8 gespalten und aktiviert, wobei sich hier eine mögliche Überexpression von Bcl-2 oder Bcl-X_L nicht signifikant auf das Ausmaß der Apoptose auswirkt (SCAFFIDI et al., 1998).

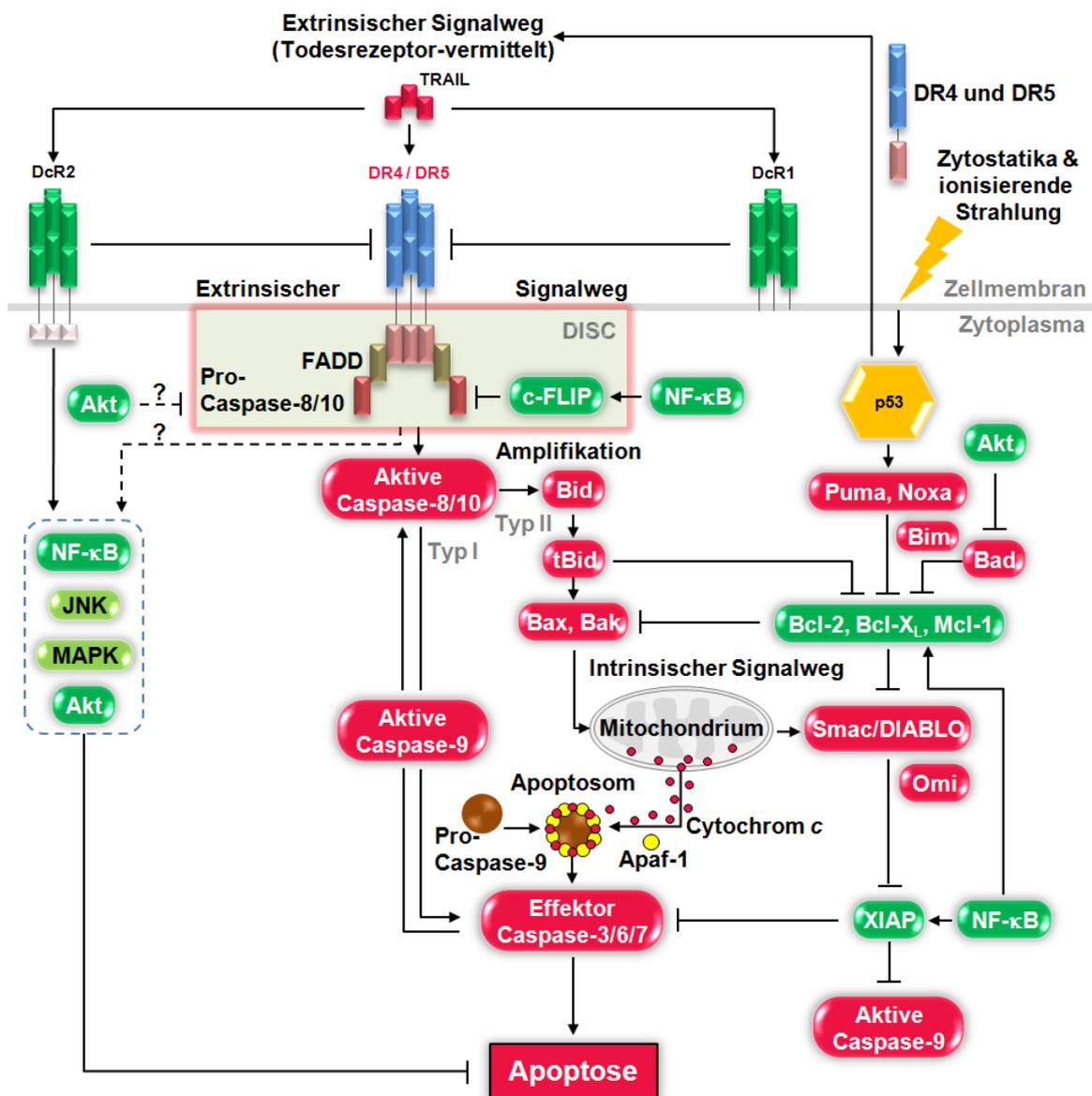


Abb. 1.4: Signalwege der TRAIL-vermittelten Apoptose (Für Erläuterungen siehe Text)

Die physiologische Rolle von TRAIL ist bisher wenig bekannt. Die weit verbreitete Expression von TRAIL unter pro-inflammatorischen Bedingungen und die Fähigkeit, sowohl Zelltod- wie auch Zellüberleben-aktivierende Signalwege zu induzieren, lässt auf eine regulierende Funktion in der Immunantwort schließen: Man nimmt dabei an, dass TRAIL - ebenso wie CD95L - neben dem Immunsystem auch in anderen Geweben bzw. Organen durch Induktion von Apoptose eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Zellhomöostase spielt (KAYAGAKI et al., 1999; KIMBERLEY & SCREATON, 2004; BENEDICT & WARE, 2012).

1.6.2 Die Resistenz gegenüber der TRAIL-vermittelten Apoptose

Anfangs weckte TRAIL ein besonderes Interesse, da in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass insbesondere Tumorzellen einer TRAIL (rhs-TRAIL)-induzierten Apoptose zugänglich sind, während sich die meisten normalen Zellen als weitgehend TRAIL-resistent erwiesen haben (ASHKENAZI et al., 1999; WALCZAK et al., 1999; NAGATA, 2000; WALCZAK & KRAMMER, 2000; KIM et al., 2001b; NAGANE et al., 2001; ALMASAN & ASHKENAZI, 2003; LEBLANC & ASHKENAZI, 2003; KOSCHNY et al., 2007).

Während andere Mitglieder der TNF-Familie wie CD95L und TNF α durch deren systematische Toxizität therapeutisch nur beschränkt einsetzbar sind (OGASAWARA et al., 1993), gab TRAIL aufgrund seiner geringeren Toxizität gegenüber normalen Zellen und höheren Spezifität für Tumorzellen Anlass zur Hoffnung auf eine mögliche klinische Anwendung (ALMASAN & ASHKENAZI, 2003; LEBLANC & ASHKENAZI, 2003; KOSCHNY et al., 2007).

Bisher sind die zugrunde liegenden Mechanismen für die tumorspezifische Wirkung von TRAIL noch nicht eindeutig geklärt und Gegenstand laufender Forschungsarbeiten. Enttäuschenderweise hat sich dabei gezeigt, dass auch eine Vielzahl von Tumorzellen auf eine alleinige Behandlung mit TRAIL nicht oder nur insuffizient ansprechen.

Als mögliche Ursachen dieser unterschiedlichen TRAIL-Empfänglichkeit kommen nach heutiger Vorstellung verschiedene intrazelluläre Regulationsebenen innerhalb des TRAIL-vermittelten Apoptosesignalweges in Betracht (vgl. Abb. 1.4), wie beispielsweise die TRAIL-Rezeptoren bzw. die DR5-Spleißvarianten, der DISC oder die intrinsische mitochondriale Todesmaschinerie der Zelle (MELLIER et al., 2010). Die TRAIL-induzierte Apoptose setzt - homolog zu CD95L - ebenfalls die Bildung eines DISC-Komplexes mit dem Adaptarprotein FADD voraus, dennoch kann die unterschiedliche TRAIL-Sensibilität unter Umständen auf der ebenso TRAIL-abhängig induzierbaren Aktivierung der zellproliferationsfördernden anti-apoptotischen Signalwege von NF- κ B, JNK/SAPK und Akt/PKB beruhen: Für die TRAIL-Resistenz *in vivo* scheint dabei vor allem der Akt-Signalweg von funktioneller Bedeutung zu sein (DAVIS, 2000; ZHANG & FANG, 2005; FALSCHLEHNER et al., 2007; MELLIER et al., 2010). Tabelle 1.2 fasst die möglichen Resistenzmechanismen gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose in Tumorzellen zusammen.

Tab. 1.2: Mögliche Resistenzmechanismen gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose in Tumorzellen

EBENE DER TRAIL-RESISTENZ	BETEILIGTE PROTEINE	MÖGLICHE MECHANISMEN
TRAIL-Spleißvarianten	TRAIL- β und - γ	<p>veränderte Rezeptor-Bindungsdomäne ((KRIEG et al., 2003):</p> <ul style="list-style-type: none"> • kompetitive Bindung mit DR4/DR5 für normalen TRAIL-Liganden • Bildung schwach Apoptose-induzierender Rezeptor-Komplexe mit DR4/DR5
TRAIL-Rezeptoren und DISC	Todesrezeptoren DR4/DR5	<ul style="list-style-type: none"> • verminderte Expression durch: Herunterregulation von Gesamtproteinmengen aufgrund epigenetisches Silencings, defizientes Transports zur Zelloberfläche sowie intrazellulärer Retention und konstitutiver Endozytose • dysfunktionale TRAIL-Todesrezeptoren durch: Mutation/Deletion von DR4/DR5-Genen, post-translationalen Modifikationen wie z.B. aufgrund fehlender O-Glykosylierung/Palmitoylierung von DR4/DR5
	DR5-Spleißvarianten TRICK-2A und -2B	<ul style="list-style-type: none"> • kompetitive Bindung mit DcR1/DcR2 für alle TRAIL-Liganden • Bildung unfunktionaler Rezeptor-Komplexe mit DcR1/DcR2
	Decoy-Rezeptoren DcR1/DcR2	<ul style="list-style-type: none"> • kompetitive Bindung mit DR4/DR5 für alle TRAIL-Liganden • Bildung unfunktionaler Rezeptor-Komplexe mit DR4/DR5
	DcR2-Spleißvariante TRAIL-R4- β	<p>Fehlen der ersten TRAIL-Liganden-Bindungsdomäne (CRD) (KRIEG et al., 2006):</p> <ul style="list-style-type: none"> • kompetitive Bindung mit DR4/DR5 für alle TRAIL-Liganden • Bildung unfunktionaler Rezeptor-Komplexe mit DR4/DR5
	c-FLIP	Zunahme der Proteinexpression hat hemmende Wirkung auf die Aktivierung von Caspase-8 am DISC
Mitochondrien	Initiator-Caspase-8	<p>verminderte Proteinexpression durch:</p> <ul style="list-style-type: none"> • epigenetisches Silencing • beschleunigte Degradation
	Anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie	Zunahme der Expression von Bcl-2/ Bcl-X _L /Mcl-1: blockiert die Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren aus Mitochondrien
	Pro-apoptotische "BH3-only" Proteine	verminderte Expression von Bax: beeinträchtigt die Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien
	Smac/DIABLO	gestörte Freisetzung aus den Mitochondrien: kann seine inhibitorische Wirkung auf IAPs nicht entfalten
Andere Signalwege	IAPs	Zunahme der Expression von XIAP/Survivin: inhibiert die Aktivierung/Aktivität von Caspasen-3/-9/-7
	NF- κ B	kann durch Auslösung der Expression von anti-apoptotischen Faktoren (XIAP, c-IAP1, c-IAP2, c-FLIP, Bcl-2, Bcl-X _L , Bcl-2A1, DcR1) zur TRAIL-Resistenz beitragen, aber Zelltyp-spezifisch durch Induktion der DR/DR5-Expression auch an der TRAIL-vermittelten Apoptose beteiligt sein
	MAP-Kinasen (JNK/SAPK)	Kontroversen in Bezug auf ihre Rolle bei der TRAIL-induzierten Apoptose
	Akt/PKB	führt zur Expressionszunahme von anti-apoptotischen Faktoren (c-FLIP, XIAP, Bcl-2 und zur Expressionsabnahme von pro-apoptotischen Faktoren (Bad, ein Mitglied der Bcl-2-Familie, Caspase-9) sowie zur Inaktivierung der Bid-Spaltung und inhibiert die TRAIL-induzierten Apoptose

Modifiziert nach MELLIER et al., 2010

Vorangegangene Untersuchungen konnten zeigen, dass humane Nierenzellkarzinome eine enorme Heterogenität in der Sensitivität gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose aufweisen, obwohl sie über die Apoptose-induzierenden DR4- und DR5-Todesrezeptoren verfügen (ASHKENAZI et al., 1999; DEJOSEZ et al., 2000; PAWLOWSKI et al., 2000; RAMP et al., 2002, 2001; OYA et al., 2001; RAMP et al., 2003; HEIKAUS et al., 2007). Regulationsmechanismen dieser heterogenen TRAIL-Sensitivität von Nierenzellkarzinomen sind bislang jedoch weitgehend unbekannt.

1.7 Inhibitoren der Apoptose

Da eine einmal induzierte Apoptose unter anderem aufgrund der Irreversibilität der Caspase-vermittelten Substratspaltung unwiderruflich zum Tod der Zelle führt, verfügen die Zellen über zusätzliche Möglichkeiten der Feinregulation des Apoptose-Prozesses, von denen die wichtigsten im Folgenden näher erläutert werden.

1.7.1 Proteine der IAP-Familie als Inhibitoren der Apoptose

Nicht nur die Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie, zu der sowohl pro- als auch anti-apoptische Proteine zählen (vgl. 1.5.1.1), auch die Mitglieder der Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP)-Familie haben Einfluss auf die Regulation der Apoptose. Eine in der Zelle verstärkte Bildung der IAP-Proteine hemmt sowohl die Liganden-induzierte als auch eine durch Chemo- oder Strahlentherapie-induzierte Apoptose (DEVERAUX et al., 1997; ROY et al., 1997; TAMM et al., 1998; DUCKETT et al., 1996; NACHMIAS et al., 2004). IAPs wurden erstmalig in Baculoviren entdeckt. Dabei zeigte sich, dass IAPs zu einer Unterdrückung des Zelltodes der mit dem Baculovirus infizierten Wirtszellen führen (CROOK et al., 1993; BIRNBAUM et al., 1994). Seitdem wurden Spezies-übergreifend viele weitere IAP-Vertreter identifiziert (SCHIMMER, 2004). Allen IAPs ist gemeinsam, dass sie eine bis drei BIR-Domänen (Baculoviral IAP-Repeat) enthalten, die jeweils aus etwa 70 Aminosäuren bestehen und in der Mehrheit der IAPs für die Hemmung der Apoptose verantwortlich sind (WRZESIEN-KUS et al., 2004). Im humanen Organismus wurden bisher acht verschiedene IAPs beschrieben, wobei XIAP (X-chromosome-linked IAP), c-IAP1, c-IAP2 (cellular IAP1/2) und NAIP (Neural Apoptosis-Inhibitory Protein) alle drei BIR-Domänen besitzen, Survivin und BRUCE (BIR Repart containing Ubiquitin-Conjugating Enzyme) lediglich die BIR1-Domäne enthalten und ML-IAP (Melanoma IAP) und ILP2 (IAP-like protein 2) ausschließlich die BIR3-Domäne aufweisen (SCHIMMER, 2004). Definitionsgemäß werden alle Proteine, die eine BIR-Domäne enthalten, als IAPs angesehen. Da nicht alle BIR-Domänen-enthaltenden Proteine dabei auch wirklich eine anti-apoptische Funktion zu haben scheinen, wird zwischen BIR-tragenden Proteinen (BIRCs; BIR containing proteins) und IAPs unterschieden (UREN et al., 1998; MILLER, 1999). In erster Linie hemmen IAPs die Apoptose, indem sie an Caspase-3, -7 und -9 binden, und dadurch deren Aktivierung und Aktivität blockieren. Am stärksten hemmend gegenüber allen Caspasen wirkt hierbei XIAP, das mit seiner BIR3-Domäne an die Caspase-9 bindet (DEVERAUX et al., 1997, 1999), während die Region zwischen BIR1 und BIR2 Caspase-3 und -7 inhibiert (RIEDL & SHI, 2004). Zudem konnte in Überexpressionsstudien gezeigt werden, dass XIAP in der Lage ist, die Zelle vor Bax-

und CD95-induzierter Apoptose zu schützen (DEVERAUX et al., 1997). Die Feststellung, dass eine vermehrte IAP-Expression mit einer verminderten Apoptose-Bereitschaft der Zelle einhergeht, ist auch mit der Beobachtung vereinbar, dass in Tumoren oftmals eine abnormal hohe Expression einzelner IAPs nachweisbar ist (TAMM et al., 2000; ADIDA et al., 2000). Darüber hinaus scheinen einige IAPs auch Einfluss auf die Zellzyklusregulation zu haben. Survivin beispielsweise spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zytogenese, bezüglich XIAP wird eine solche Funktion ebenfalls diskutiert (LI et al., 1999; LEVKAU et al. 2001).

1.7.2 Gegenspieler der IAP-Proteine

Die Wirkung der IAPs wiederum wird durch die in den Mitochondrien gelegenen Proteine Smac/DIABLO (Second mitochondrial derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI) und HtrA2/Omi (High temperature requirement A) kontrolliert. Wird eine Apoptose induziert, werden die Proteine Smac/DIABLO und HtrA2/Omi zeitgleich mit Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytoplasma freigesetzt. Smac/DIABLO und HtrA2/Omi werden hierbei in ihre aktive Form überführt und sind dadurch in der Lage, IAP-Proteine zu binden und zu inhibieren. Smac/DIABLO und HtrA2/Omi haben somit eine pro-apoptotische Wirkung (VERHAGEN et al., 2000; DU et al., 2000; VERHAGEN et al., 2002; SUZUKI et al., 2001). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Interaktion mit den IAPs über eine N-terminale Peptidsequenz, bestehend aus 4 Aminosäuren, vermittelt wird. (ARNT et al., 2002; LIU et al., 2000). Homologe Sequenzen sind ebenfalls in den IAP-Antagonisten Reaper, Hid, Grim und Sickie aus *Drosophila melanogaster* zu finden (GOYAL et al., 2000). Die Konsensussequenz des hochkonservierten Motivs mit der Abfolge A-(K/T/V/I)-(P/A/E)-(F/E/I/S/Y) wird als IBM (IAP-binding motif) bezeichnet. Diese Sequenz ist homolog zur Caspase-9-Region (SRINIVASULA et al., 2001), die mit XIAP bindet, sodass sich Caspase-9 und Smac/DIABLO kompetitiv verhalten. Durch die Bindung von XIAP ist Smac/DIABLO in der Lage, die Interaktion von XIAP und Caspase-9 zu unterbinden und so die Caspase-9-Inhibition aufzuheben (SRINIVASULA et al., 2001). Die Apoptose hemmende Wirkung von XIAP an den Effektor-Caspasen-3 und -7 kann durch Smac/DIABLO ebenfalls aufgehoben werden (HUANG et al., 2003).

1.8 Apoptose-Induktion durch Zytostatika und ionisierende Strahlen

Der Sammelbegriff "Zytostatika" bezeichnet ein breites Spektrum meist niedermolekularer, organischer Substanzen, die in der Lage sind, das Zellwachstum zu verhindern und daher als Chemotherapeutika in der konventionellen Tumorthherapie eingesetzt werden. Die meisten Zytostatika sind geno-toxisch, d.h. sie bewirken eine Schädigung der DNA, oder sie führen während der Mitose zu einer Schädigung des Spindelfaserapparates und blockieren dadurch den Zellzyklus. Das Ziel der Bestrahlung von Tumorzellen ist ebenfalls der Zellkern mit der darin enthaltenen DNA. Neben der Chemotherapie spielt daher auch die Behandlung mit ionisierenden Strahlen eine zentrale Rolle bei der Behandlung maligner Tumoren. In Zellkulturstudien konnte nachgewiesen werden, dass sowohl durch Zytostatika als auch durch ionisierende Strahlung die Progression des Zellzyklus der Tumorzellen blockiert wird und hierdurch der Apoptoseprozess aktiviert werden

kann, was zu einer Reduktion des Tumors führt. (BARRY et al., 1990; HICKMAN, 1992; LOWE et al., 1993; BROWN & WOUTERS, 1999; ZHIVOTOVSKY et al., 1999; VERHEIJ & BARTELINK, 2000; LOWE, 2000; IGNEY & KRAMMER, 2002; DEBATIN & KRAMMER, 2004; NORBURY & ZHIVOTOVSKY, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde insbesondere die Wirkung des geno-toxischen (DNA-schädigenden) Zytostatikums Topotecan (Hycamtin[®]) sowie ionisierender Gamma-Strahlung auf das Nierenzellkarzinom untersucht.

Topotecan stellt nur eine geringe Substrataffinität für die Effluxpumpe MDR dar und ist somit ein geeignetes Zytostatikum für eine Chemotherapie maligner Tumoren, da dessen intrazelluläre Konzentration nur geringfügig durch die MDR reduziert wird (CHEN et al., 1991; HENDRICKS et al. 1992; CHEN & LIU, 1994a, 1994b; SORENSEN et al., 1995). Heute wird Topotecan als Zytostatikum zur Behandlung von verschiedenen malignen Tumoren, insbesondere der Ovarial- und Lungenkarzinome, eingesetzt. Bei Topotecan handelt es sich um einen Inhibitor der Topoisomerase-I, deren physiologische Funktion für die Replikation der DNA von entscheidender Bedeutung ist. Topotecan bildet während der S-Phase des Zellzyklus mit der DNA und der Topoisomerase-I einen stabilen Komplex. Es kommt zur Arretierung der Replikationsgabel, zum irreversiblen DNA-Strangbruch, damit zu bleibenden DNA-Schäden und über eine Apoptose zum Zelltod (HSIANG et al., 1989; LIU et al., 1989; KOLLMANNSSBERGER et al., 1999; KRATZMEIER et al., 2000; SCHLIEPHACKE et al., 2004; LEGARZA & YANG, 2006;). Die Apoptose-induzierende Wirkung konnte *in vitro* an einigen Tumoren wie Gliomen und Lymphomen gezeigt werden (SEITER et al., 1997; WINTER & WELLER, 1998).

Obwohl ähnliche Beobachtungen bereits ebenfalls an einzelnen Nierenkarzinomzelllinien gemacht werden konnten (DEJOSEZ et al., 2000; RAMP et al., 2001, 2003; HEIKAUS et al., 2007), sind die Regulationsmechanismen, welche die ausgeprägte Resistenz sowie die Sensitivität dieses malignen Tumors gegenüber Zytostatika-induzierter Apoptose bestimmen, bislang jedoch nur unvollständig verstanden.

Neben der Verwendung von zytostatisch wirkenden Substanzen können DNA-Schäden auch durch hochenergetische ionisierende Strahlen induziert werden. Der Begriff "ionisierende Strahlung" fasst die beim Kernzerfall entstehenden energiereichen wellen- oder teilchenförmigen Strahlen (Röntgen- und Gamma-Strahlung bzw. Alpha-, Beta- und Neutronenstrahlung) zusammen, welche die Materie ionisieren können. Die Energiedosis, die bei der Wechselwirkung von Strahlung mit Materie auf die Materie übertragen wird, ist definiert als absorbierte Energie pro Masse und wird in der Einheit Gray (Gy) angegeben. Ionisierende Strahlung kann die DNA direkt oder indirekt schädigen. Beim "direkten Effekt" (Alpha- und Beta-Strahlung) führt die Bestrahlung zu primären Schäden am DNA-Molekül. Beim "indirekten Effekt" (Gamma-Strahlung) hingegen handelt es sich um die bestrahlungsinduzierte Formation hochreaktiver Radikale, die das DNA-Molekül chemisch modifizieren und dadurch irreversibel schädigen können (FEI & EL-DEIRY, 2003; ILIAKIS et al., 2003). Im Falle der vor allem in der Tumorthherapie eingesetzten Gamma-Strahlung resultiert dies vorwiegend in der Erzeugung von Doppelstrangbrüchen am DNA-Molekül. Es wird berechnet, dass nach Gamma-Bestrahlung mit 1 Gy 30 bis 40 Doppelstrangbrüche pro Zelle induziert werden (JENNER et al., 1998; NEWMAN et al., 2000; JENNER et al., 2001). Zellkulturanalysen haben gezeigt, dass Tumorzellen vor allem in der G2- und M-Phase des Zellzyklus äußerst strah-

lungssensitiv sind und sich in der späten S-Phase als strahlungsresistent erweisen (SINCLAIR et al., 1965). Wie Zytostatika führen auch die durch Gamma-Bestrahlung vermittelten DNA-Schäden zur Arretierung des Zellzyklus und über eine p53-abhängige Apoptose zum Zelltod (VERHEIJ & BARTELINK, 2000; NORBURY & ZHIVOTOVSKY, 2004). Dabei verläuft die Strahlungsinduzierte Apoptose im Wesentlichen Caspase-8-unabhängig und wird somit fast ausschließlich über mitochondriale Wege via Freisetzung von Cytochrom c und nachfolgender Aktivierung von Caspase-9 vermittelt und durch Bcl-2 komplett gehemmt (ZHIVOTOVSKY et al., 1999, BELKA et al., 2000, 2001; NEWTON & STRASSER, 2000; JOSEPH et al., 2001; RUDNER et al., 2001).

Da jedoch keine systematischen Untersuchungen zur Induzierbarkeit der Apoptose durch ionisierende Gamma-Strahlung in Nierenkarzinomzelllinien vorliegen, ist der genaue intrazelluläre Signalweg der durch ionisierende Gamma-Strahlung induzierten Apoptose im humanen Nierenzellkarzinom bislang unbekannt.

1.8.1 Der Tumorsuppressor p53

Zytostatika, wie z.B. Topotecan, oder ionisierende Strahlung, wie z.B. Gamma-Strahlung, führen zu einer Aktivierung des DNA-Damage-Pathways. Je nach Schwere des DNA-Schadens ist die Zelle daraufhin entweder in der Lage, den vorliegenden Schaden mit Hilfe verschiedener Reparaturmechanismen zu beheben, oder sie wird, wenn eine vollständige Reparatur nicht möglich ist, durch Einleitung der Apoptose aus dem Zellverband eliminiert (LANE, 1992; MILNER, 1995; LEVINE, 1997; HORN & VOUSDEN, 2007). Das Tumorsuppressorgen *p53* hat hierbei eine wichtige Schlüssel-funktion, indem es in der Zelle die Funktion eines Sensors für den vorhandenen DNA-Schaden übernimmt und dementsprechend entweder den Zellzyklus-Arrest oder die Apoptose einleitet (LOWE et al., 1993; DULIC et al., 1994; HORN & VOUSDEN, 2007).

Das Tumorsuppressorgen *p53* codiert für ein nukleäres aus 393 Aminosäuren bestehendes Protein, das die Aufgabe eines Transkriptionsfaktors hat, indem es die Expression von Genen reguliert, welche sowohl an der Kontrolle des Zellzyklus und der Induktion der Apoptose aber auch an der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität durch Kontrolle der DNA-Reparatur sowie Prozessen der zellulären Seneszenz und Angiogenese beteiligt sind (VOGELSTEIN et al., 2000) (Abb. 1.5a). Aufgrund seiner relativ kurzen Halbwertszeit von ca. 6-20 Minuten sind unter normalen Bedingungen nur geringe Mengen von p53 in der Zelle vorhanden. Zudem wird p53 über einen negativen auto-regulatorischen Rückkopplungsmechanismus mit dem Proto-Onkogen *MDM2* (murine double minute-2) reguliert (AMUNDSON et al., 1998; MARINE et al., 2006).

P53 führt durch transkriptionelle Aktivierung des *mdm2*-Gens zur Expression der Ubiquitin-Ligase MDM2, welche ihrerseits zum einen durch Bindung an die N-terminale Transaktivierungsdomäne von p53 die Transkription von p53-Zielgenen verhindert und zum anderen den Abbau von p53 steuert (BARAK et al., 1993; CHEN et al., 1994; Amundson et al., 1998). Unter normalen Bedingungen liegt p53 daher inaktiv in geringen Konzentrationen in der Zelle vor. Erst durch zelluläre Stress-Signale, wie die Schädigung der DNA oder die Aktivierung zellulärer Proto-Onkogene, wie

z.B. *Ras*, *Myc* oder *E2F1* (ZINDY et al., 1998; LINDSTROM et al., 2003) (Abb. 1.5b), wird p53 aktiviert und es kommt zu einem transitorischen Anstieg der p53-Konzentration.

Die Induktion von p53-Protein nach DNA-Schädigung erfolgt im Wesentlichen durch post-translationale Modifikation des p53-Proteins. Das p14^{ARF}-Protein bindet an MDM2, verhindert dadurch den MDM2-vermittelten Abbau von p53 und führt somit zur Stabilisierung von p53 (SHERR & WEBER, 2000). Die transkriptionelle Aktivität des aktiven p53 wird durch weitere Faktoren, wie beispielsweise ASPP (Apoptosis-stimulating protein for p53) oder iASPP (inhibitor of ASP), reguliert (SAMUELS-LEV et al., 2001; BERGAMASCHI et al., 2003).

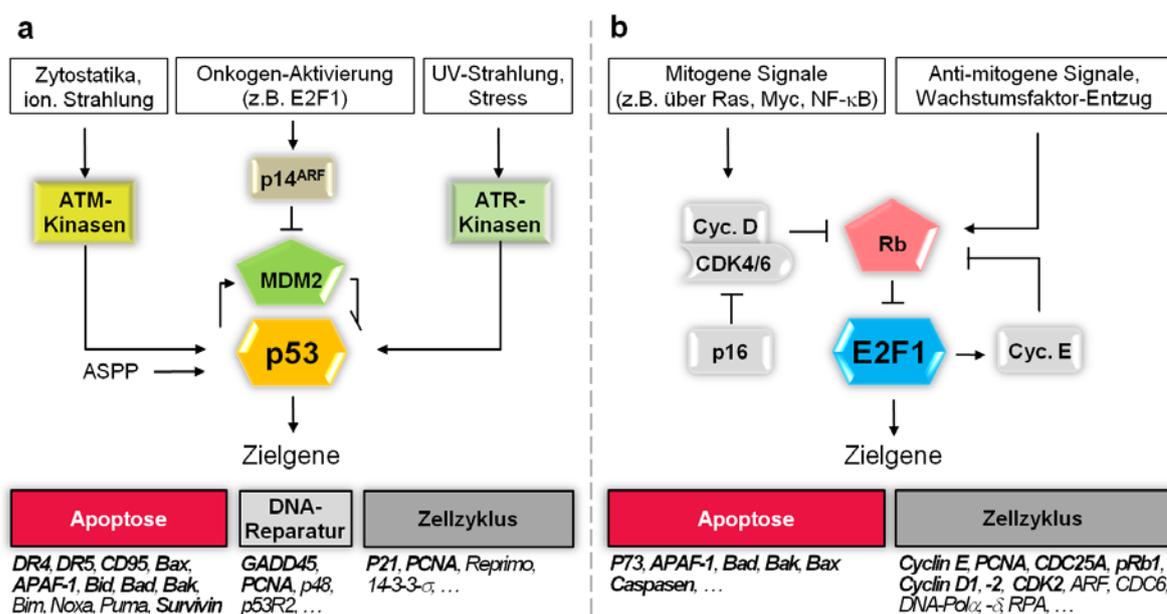


Abb. 1.5: Vereinfachte Übersichtsdarstellung der Signalwege von p53 und E2F1 (a) Während DNA-schädigende Faktoren wie Zytostatika oder eine Bestrahlung mit ionisierender Gamma-Strahlung, eine Aktivierung von p53 über ATM-Kinasen auslösen, erfolgt die p53-Aktivierung ebenfalls nach Exposition mit UV-Strahlung sowie nach verschiedenen Arten von zytotoxischem Stress durch Kinasen der ATR-Familie (Ataxia telangiectasia related). Die Onkogen-induzierte Aktivierung von p53 führt zur Aktivierung von p14^{ARF}, eines direkten MDM2-Inhibitors, das hierdurch indirekt eine Stabilisierung von p53 bewirkt. Die Aktivierung von p53 führt schließlich zur transkriptionellen Aktivierung der p53-Zielgene, über die p53 bei zellulären Prozessen wie Apoptose, DNA-Reparatur oder Zellzyklus involviert. (b) Die transkriptionelle Aktivität von E2F1 wird über verschiedene Mechanismen moduliert. Der bestbekannte Mechanismus ist seine Interaktion mit dem Retinoblastom-Protein Rb (pRb), einem Tumorsuppressor, das zu der Gruppe "Pocket-Proteine" gehört. Die Formation der Rb-E2F1-Komplexe wird über den Zellzyklus reguliert. Hierbei aktivieren G1-Cycline (z.B. D-Typ Cycline) ihre assoziierten Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 oder CDK6, die wiederum Rb-Proteine phosphorylieren. Dies hat die Dissoziation der Rb-E2F-Komplexe zur Folge und führt zur Derepression und Aktivierung der E2F1-Zielgene. Viele E2F1-Zielgene haben eine Schlüsselfunktion im S-Phase-Eintritt und Zellzyklus-Fortschritt (YAMASAKI, 2003). Eine DNA-Schädigung durch Zytostatika oder ionisierende Strahlen führt weiterhin zur Aktivierung von natürlichen CDK-Inhibitoren der INK4-(p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} und p14^{INK4D}) und CIP/KIP-(p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1} und p57^{KIP2}) Familie, was entscheidend für die Feinregulation der Zellzyklusprogression von Bedeutung ist. Bei Überexpression oder Aktivierung durch DNA-Schäden kann E2F1 die Transkription von zahlreichen pro-apoptotischen Genen induzieren und damit das apoptotische Selbstzerstörungsprogramm aktivieren. In Abbildung sind exemplarisch einige p53- und E2F1-Zielgene aufgeführt. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Faktoren sind hervorgehoben (Modifiziert nach VOGELSTEIN et al., 2000; WETHKAMP, 2006 [Dissertation]; POLAGER & GINSBERG, 2009)

Die besondere medizinische Bedeutung von *p53* erklärt sich aus dem Befund, dass dieses Tumorsuppressorgen in mehr als 50% aller menschlichen Tumoren mutiert ist. Studien haben gezeigt, dass ein Verlust der *p53*-Aktivität mit einem erhöhten Auftreten onkogener Mutationen assoziiert ist (LEVINE, 1997; VOUSDEN & LU, 2002). Neben *p53* sind mit den Homologen *p63* und *p73* inzwischen zwei weitere Faktoren bekannt, welche durch Regulation der Expression von *p53*-Zielgenen ebenfalls Zellzyklusarrest und Apoptose vermitteln können, die jedoch in menschlichen Tumoren nur selten inaktiviert sind (LEVRERO et al., 2000; IRWIN & KAELIN, 2001).

1.8.2 Die Rolle von *p53* in der Apoptose

Durch geno-toxische Substanzen wie beispielsweise Topotecan oder durch Gamma-Strahlung verursachte DNA-Schäden bewirken über eine Aktivierung von verschiedenen Proteinkinasen wie ATM (Ataxia telangiectasia mutated), ATR (ATM-und-Rad3-related Protein), CHK1 und CHK2 (Checkpoint kinase) sowohl eine Stabilisierung und Aktivierung des Tumorsuppressors *p53* als auch eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F1 (vgl. 1.8.3) (eines weiteren wichtigen Regulators von Zellzyklus und Apoptose) (VOUSDEN & LU, 2002; STEVENS et al., 2003; NORBURY & ZHIVOTOVSKY, 2004). Die Phosphorylierung von *p53* und MDM2 verhindert deren Bindung und führt dadurch zu einer Stabilisierung und Oligomerisierung von *p53* (SMITH & FORNACE, 1995). Liegt ein DNA-Schaden vor, bewirkt die *p53*-Aktivierung eine Expression von DNA-Reparaturgenen wie *GADD45* (Growth Arrest and DNA Damage-45) und *PCNA* (Proliferating Cell Nuclear Antigen), die zu einer Reparatur des DNA-Schadens führen (HOLLANDER et al., 1993; SMITH et al., 1994; VOGELSTEIN et al., 2000; MAEDA et al., 2002).

Bei größeren DNA-Schäden initiiert das *p53*-Protein durch Induktion des CDK2 (Cyclin-de-dependent kinase-2)-Inhibitors *p21^{CIP/WAF1}* den Zellzyklusarrest (KASTAN et al., 1991; KUERBITZ et al., 1992; ATTARDI et al., 1996; AGAMI & BERNARDS, 2000), um DNA-Reparaturprozesse zu ermöglichen. Ist der DNA-Schaden hingegen zu groß, erfolgt eine Elimination der Zelle durch die Induktion der Apoptose (LOTEM & SACHS, 1993).

Die *p53*-induzierte Apoptose beruht dabei wahrscheinlich größtenteils auf der transkriptionellen Aktivierung und vermehrten Expression von pro-apoptotischen Zielgenen wie *Bid*, *Bim*, *Bax*, *Puma*, *Noxa*, *APAF-1*, *CD95*, *DR4* und *DR5* (WU et al., 1997; YU et al., 1999; VOUSDEN & LU, 2002; NORBURY & ZHIVOTOVSKY, 2004) sowie der transkriptionellen Repression anti-apoptotischer Gene wie zum Beispiel *Survivin* (ZHOU et al., 2002) (vgl. Abb. 1.5a). Darüber hinaus ist *p53* auch in der Lage, durch direkte Bindung an Bcl-2 oder Bcl-X_L und Aktivierung von Bax und/oder Bak den intrinsischen Signalweg der Apoptose Transkriptions-unabhängig zu induzieren (MIHARA et al., 2003; CHIPUK et al., 2004; LEU et al., 2004). Dies erhärtet die Beobachtungen früherer Untersuchungen, die darauf hinweisen, dass die durch *p53* vermittelte Apoptose-Induktion nicht zwangsläufig mit einer *de novo* RNA-/Protein-Biosynthese einhergehen muss (CAELLES et al., 1994). Darüber hinaus kann *p53* unabhängig von transkriptioneller Aktivität, z.B. durch Veränderung des intrazellulären Transports von Todesrezeptorproteinen, auch extrinsische Signalwege der Apoptose aktivieren (BENNETT et al., 1998).

Der genaue Wirkungsmechanismus der p53-vermittelten Apoptose ist bislang nur unvollständig verstanden. Nach heutiger Vorstellung entfaltet p53 seine Apoptose-induzierende Wirkung im Wesentlichen über seine Funktion als Transkriptionsfaktor. Während die verstärkte Bildung pro-apoptotischer Faktoren der Bcl-2-Familie möglicherweise die intrinsische Todesmaschinerie der geschädigten Zelle fördert, könnte die Hochregulation von Todesrezeptoren zur Sensibilisierung der Zelle gegenüber extrinsisch vermittelten Apoptosesignalen führen (MIYASHITA & REED, 1995; OWEN-SCHAUB et al., 1995; ODA et al., 2000).

Die Tatsache, dass eine Resistenz gegenüber Apoptose nach DNA-Schädigung häufig mit dem Vorhandensein von nicht-funktionellem p53 oder dessen gänzlichen Fehlens assoziiert ist, weist auf die funktionelle Bedeutung von p53 bei DNA-Schädigung induzierter Apoptose hin. Aufgrund der fehlenden Induktion bzw. Repression p53-abhängiger Zielgene kann die geschädigte Zelle dann nicht adäquat auf DNA-Schäden reagieren. Verschiedene maligne Tumoren, einschließlich der Nierenzellkarzinome, zeigen daher eine ausgeprägte Resistenz gegenüber der durch DNA-Schäden induzierten Apoptose, obwohl sie über ein funktionelles p53-Protein verfügen (HAITEL et al., 2000).

Der Aktivitätszustand von p53 scheint somit einer der wichtigsten Faktoren bei der Entstehung von Zytostatika- und Strahlungsresistenz in Tumorzellen zu sein. Der durch p53 aktivierte Signalweg der Apoptose scheint in erster Linie mit der Reaktion der Zelle auf Zellschädigung bzw. zellulären Stress assoziiert zu sein. Aber auch in p53-mutierten Zellen kann eine Zellschädigung Apoptose auslösen. Dies ist vor allem auf die Substitutionsfunktion des p53-homologen Proteins p73 zurückzuführen, das bei Ausfall von p53 pro-apoptotisch wirkt und teilweise eine defekte p53-Funktion ersetzen kann (LEVRERO, 2000). In diesem Zusammenhang kommt dem Transkriptionsfaktor E2F1, einem weiteren Zellzyklus- und Apoptoseregulator, eine besondere Bedeutung zu.

1.8.3 Die Rolle von E2F1 in der Apoptose

Die im Laufe des letzten Jahrzehnts erhobenen experimentellen Daten lassen erkennen, dass die intrazellulären Signalwege von Zellzyklus und Apoptose über komplex vernetzte Interaktionen eng miteinander verknüpft sind (GINSBERG, 2002; POLAGER & GINSBERG, 2009).

E2F1, das zur Transkriptionsfaktor-Familie E2F (DIMOVA & DYSON, 2005) zählt, besitzt dabei die Fähigkeit, sowohl Proliferation (WU et al., 2001) als auch Apoptose zu induzieren (WU & LEVIN, 1994; QIN et al., 1994; SHAN et al., 1994; KOWALIK et al., 1995; DEGREGORIE et al., 1997; KOWALIK et al., 1998; PEDICONI et al., 2003; JOHNSON & DEGREGORI, 2006) (vgl. Abb. 1.5b, 1.6), indem es in einer engen Kooperation mit p53 steht und zusätzlich über das Schicksal der Zelle entscheidet (WU & LEVINE, 1994). Geno-toxische Stress-Signale führen hierbei - analog zu p53 - zu einer Stabilisierung und Aktivierung von E2F1, was teilweise gemeinsam durch eine Beteiligung von p53-regulierenden Proteinen wie ATM, p14^{ARF} und MDM2 stattfindet (KOWALIK et al., 1998; POLAGER & GINSBERG, 2008, 2009). In Zellen, die kein funktionsfähiges p53 exprimieren, führt eine durch ionisierende Strahlung hervorgerufene Überexpression von E2F1 zu einer Apoptose-Induktion (KOWALIK et al., 1995; PRUSCHY et al., 1999; MENG et al., 1999).

Um bei einem Ausfall von Tumorsuppressorgenen oder in Gegenwart von geno-toxischem Stress eine Proliferation bzw. ein malignes Wachstum von Zellen zu unterbinden, nimmt somit E2F1 eine Funktion als "Schutzschalter" ein (Abb. 1.6). Nach DNA-Schädigung wird E2F1 durch Proteinkinasen der ATM-Familie phosphoryliert (LIN et al., 2001), was in einer Aktivierung von E2F1 und in der Induktion der Apoptose resultiert (STEVENS et al., 2003).

Die E2F1-induzierte Apoptose kann sowohl p53-abhängig als auch unabhängig von diesem Tumorsuppressor ablaufen (STANELLE & PUTZER, 2006). Obwohl E2F1 die Transkription mehrerer Apoptose-relevanter Gene reguliert (PEDICONI et al., 2003), ist die Apoptose-Induktion dieses Transkriptionsfaktors unabhängig von dessen Transaktivierungsdomäne. E2F1 induziert die p53-Akkumulation durch direkte Transaktivierung von p14^{ARF}, durch welches die Ubiquitin-Ligase-Aktivität von MDM2 inhibiert und dadurch Ubiquitylierung und Degradation von p53 verhindert wird (WEBER et al., 1999). Dies bewirkt eine Stabilisierung und Verstärkung der Aktivität von p53 (vgl. 1.8.2). P14^{ARF} stellt zwar eine Verbindung zwischen E2F1 und p53 dar, es ist jedoch nicht essentiell für die Onkogen-induzierte Aktivierung von p53 (RUSSELL et al., 2002; MARTELLI et al., 2001).

Die p53-unabhängige Induktion der Apoptose durch E2F1 erfolgt in erster Linie durch direkte Transaktivierung von p73 und APAF-1 sowie durch Aktivierung von Caspasen (IRWIN et al., 2000; STIEWE & PÜTZER, 2000; MORONI et al., 2001; NAHLE et al., 2002). P73 bewirkt die Transaktivierung von pro-apoptotischen p53-Zielgenen (STIEWE & PÜTZER, 2000), während APAF-1 über die Bildung des Apoptosom-Komplexes zur Einleitung der Apoptose-Induktion führt (ZOU et al., 1999). Ferner kann E2F1 seine p53-unabhängige Apoptose-induzierende Wirkung über eine inhibitorische Bindung an anti-apoptotisches NF- κ B entfalten (PHILLIPS et al., 1999; STANELLE et al., 2002; TANAKA et al., 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass E2F1 die Expression von anti-apoptotischen Faktoren der Bcl-2-Familie wie Bcl-2 und Mcl-1 stark unterdrückt (EISCHEN et al., 2001; CROXTON et al., 2002) und so zur Apoptose-Induktion beiträgt.

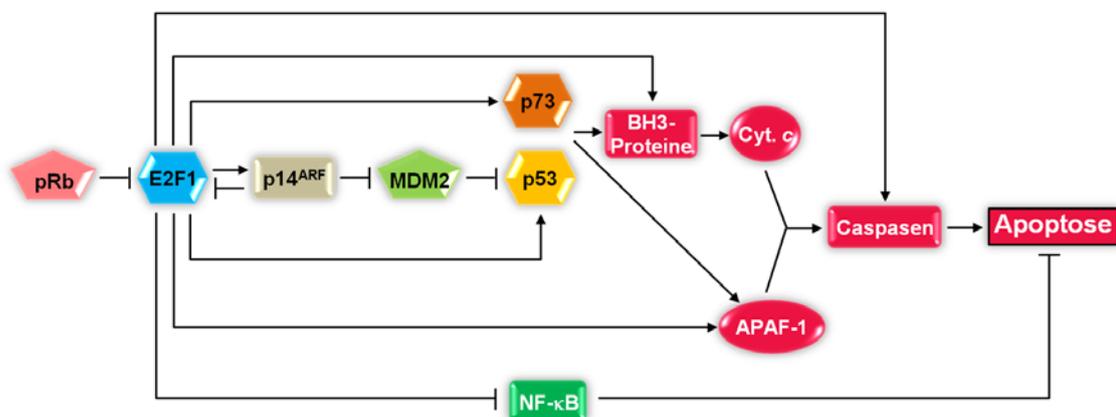


Abb. 1.6: Signalwege der E2F1-induzierten Apoptose (Für Erläuterungen siehe Text. Modifiziert nach GINSBERG, 2002)

1.9 Modulation von Apoptose über das TRAIL-System in Tumoren

Wie bereits ausgeführt, entfalten Zytostatika und ionisierende Strahlen ihre Wirkung - unter dem regulatorischen Einfluss von p53 - in erster Linie über eine Aktivierung der apoptotischen Selbstzerstörung in subletal geschädigten Tumorzellen. Die Sensibilität von Tumorzellen gegenüber einer konventionellen Chemo- und Strahlentherapie ist somit wesentlich davon abhängig, dass Schlüsselemente des Apoptoseprogrammes in der Zelle intakt sind und durch eine Therapie aktiviert werden können. Resistenz gegenüber Apoptose-Induktion, beispielsweise durch Defekte in Apoptoseprogrammen, führt zur Tumorprogression und verstärkt nachhaltig die klassischen Mechanismen der Therapieresistenz maligner Tumoren (LOWE et al., 1993; MULDERIS et al., 1997; MÜLLER et al., 1998; VERHEIJ & BARTELINK, 2000; IGNEY & KRAMMER, 2002; VOGELSTEIN et al., 2000; GÜNER et al., 2003; ZHIVOTOVSKY et al., 1999; NORBURY & ZHIVOTOVSKY, 2004; FISCHER & SCHULZE-OSTHOFF, 2005).

Der genaue Wirkmechanismus der Zytostatika- und strahlungsinduzierten Apoptose ist nicht vollständig verstanden, scheint aber, wie zuvor erwähnt, - sowohl p53-abhängig wie auch - unabhängig über den intrinsischen mitochondrialen Signalweg der Apoptose zu verlaufen. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass die Transkriptionsfaktoren p53 und E2F1, die beiden "molekularen Schalter" von Zellzyklus und Apoptose, bei DNA-Schäden schadenspezifisch durch Proteinkinasen der ATM-Familie aktiviert werden und teilweise in einer engen Kooperation ganz wesentlich an der Zytostatika- oder strahlungsvermittelten (intrinsischen) Apoptose beteiligt sind (LIN et al., 2001; NORBURY & ZHIVOTOVSKY, 2004; VOUSDEN & LU, 2002; STEVENS et al., 2003; POLAGER & GINSBERG, 2008, 2009).

Darüber hinaus kann auch der extrinsische Todesrezeptor-vermittelte Signalweg an dem Apoptoseprozess beteiligt sein, da Todesrezeptoren nachweislich eine direkte Verbindung zur intrinsischen Todesmaschinerie der Zelle haben und eine adäquate Stimulation vorausgesetzt, ihre Apoptose-induzierenden Effekten in Therapie-resistenten Tumorzellen verstärkt werden können (ASHKENAZI, 2002). Jüngste Untersuchungen weisen in diesem Zusammenhang insbesondere den Todesrezeptoren des TRAIL-Systems eine besondere Rolle zu (FULDA & DEBATIN, 2006). Von Bedeutung ist hierbei auch, dass die Aktivierung des extrinsischen Signalweges der Apoptose grundsätzlich nicht mit einem funktionsfähigen p53 gekoppelt ist und somit eine in Tumorzellen sehr häufig vorkommende Mutation des p53-Proteins unerheblich bleibt (WEN et al., 2000; WANG & EL-DEIRY, 2003a). Dadurch könnten sich sehr gute Erfolgsaussichten für eine Therapie an TRAIL-Todesrezeptoren ergeben.

Der rekombinante humane und lösliche Todesligand TRAIL (rhs-TRAIL) ist aufgrund seiner tumorselektiven Wirkung ein neues Zytostatikum, welches derzeit zur klinischen Eignung überprüft wird (ASHKENAZI et al., 1999; ALMASAN & ASHKENAZI, 2003; KOSCHNY et al., 2007; WIEZOREK et al., 2010). Da jedoch ein beträchtlicher Anteil aller bislang untersuchten Tumorzelllinien *in vitro* eine mehr oder weniger ausgeprägte Resistenz gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose aufzeigten und auch in präklinischen Tiermodellen durch die alleinige Gabe von TRAIL oft keine ausreichende Tumorwachstumskontrolle erzielt werden konnte, werden vor allem Kombinationen von TRAIL zusammen mit konventioneller Chemo- und Strahlentherapie intensiv untersucht (Tab. 1.3).

Tab. 1.3: Modulation der TRAIL-induzierten Apoptose durch Zytostatika oder Bestrahlung

MECHANISMUS DER MODULATION	ZYTOSTATIKA/BESTRAHLUNG	TUMORTYP	LITERATUR
Expressionszunahme von DR4	DXR, VP-16	Mammakarzinom	MORGAN et al., 2002
	Gamma-Bestrahlung	Leukämie	DI PIETRO et al., 2001
	DDP	Leberzellkarzinom	SHIN et al., 2002
Expressionszunahme von DR5	CPT, DDP, UV-Bestrahlung	Glioblastom	ARIZONO et al., 2003
	Gamma-Bestrahlung	Leukämie	BELKA et al., 2001
	Gamma-Bestrahlung	Mammakarzinom	CHINNAIYAN et al., 2000
	TO	Glioblastom	CIUSANI et al., 2005
	TO	Nierenzellkarzinom	DEJOSEZ et al., 2000
	Gamma-Bestrahlung	Leukämie	GONG et al., 2000
	ADR	Multiplies Myelom	JAZIREHI et al., 2001
	DDP, VP-16	Glioblastom	NAGANE et al., 2000
	CPT-11	Kolonkarzinom	NAKA et al., 2002
	DXR	Sarkom	TOMEK et al., 2003
	CPT-11, VP-16	Kolonkarzinom	WANG et al., 2003b
AraC, DXR, VP-16	Leukämie	WEN et al., 2000	
Expressionszunahme von DR4 & DR5	DDP, DXR, VP-16	Osteosarkom	BOURALEXIS et al., 2003
	DDP, DXR, VP-16	Osteosarkom	EVDOKIYOU et al., 2002
	VP-16	Mammakarzinom	GIBSON et al., 2000
	TO	Prostatakarzinom	GRIFFITH et al., 2003
	CHL, FLU	Leukämie	JOHNSTON et al., 2003
	PA	Prostatakarzinom	NIMMANAPALLI et al., 2001
	ADR, CPT, VP-16, PA, VCR, VBL	Mammakarzinom	SINGH et al., 2003
	CPT-11	Prostatakarzinom	RAY et al., 2003
	DDP	Ovarialkarzinom	SIERVO-SASSI et al., 2003
	ADR	Nierenzellkarzinom	WU et al., 2003
	CPT-11	Kolonkarzinom	XIANG et al., 2002
Expressionsabnahme von IAP	TO	Prostatakarzinom	GRIFFITH et al., 2003
	DDP, VP-16	Glioblastom	ROA et al., 2003
	AraC, VP-16	Leukämie	WEN et al., 2000
Expressionsabnahme von c-FLIP	DDP	Osteosarkom	HOTTA et al., 2003
	DXR	Prostatakarzinom	KELLY et al., 2002
	5-FU	Kolonkarzinom	LACOUR et al., 2003
	CDDO	Leukämie	SUH et al., 2003
	DDP	Melanom	SONG et al., 2003
	DDP, DXR, VP-16	Osteosarkom	VAN VALEN et al., 2003
	5-FU	Leberzellkarzinom	GANTEN et al., 2004
Expressionsabnahme von Bcl-2/-X _L	ADR, CDDP	Epitheliale Tumore	OHTSUKA et al., 2003
	CPT-11	Prostatakarzinom	RAY et al., 2003
	DDP	Ovarialkarzinom	SIERVO-SASSI et al., 2003
Expressionszunahme von Bax/Bak	VP-16	Kolonkarzinom	MIAO et al., 2003
	DDP	Blasenkarzinom	MIZUTANI et al., 2001
	5-FU	Nierenzellkarzinom	MIZUTANI et al., 2002
	CPT-11	Prostatakarzinom	RAY et al., 2003
	DDP	Ovarialkarzinom	SIERVO-SASSI et al., 2003
	5-FU	Prostatakarzinom	VON HAEFEN et al., 2004
Erhöhte Freisetzung des Cytochrom c	DDP, DXR, VP-16, GEM	Mesotheliom	LIU et al., 2001
	CCNU	Glioblastom	RÖHN et al., 2001
Expressionsabnahme von NF-κB	ACT, CPT	Leberzellkarzinom	YAMANAKA et al., 2000

5-FU: 5-Fluoruracil, ADR: Adriamycin, AraC: Cytarabin, CCNU: chlorethyl-cyclohexyl-nitroso-urea (Lomustin), CDDO: 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-olig acid, CPT: Camptothecin, CPT-11: Irinotecan, CHL: Chlorambucil, DDP: Diammindichloroplatin (II) (Cisplatin), DXR: Doxorubicin, FLU: Fludarabin, GEM: Gemcitabin, PA: Paclitaxel, TO: Topotecan, VBL: Vinblastin, VCR: Vincristin, VP-16: Etoposid. Modifiziert nach Wittmann, 2007 [Dissertation])

Hierbei konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Wirkung der TRAIL-induzierten Apoptose bei gleichzeitiger Aktivierung der DNA-Schaden/Stress-Antwort "synergistisch" verstärkt wird und darüber hinaus die primäre TRAIL-Resistenz von malignen und p53-mutierten Tumorzellen, einschließlich der einzelnen Zelllinien des Nierenzellkarzinoms (DEJOSEZ et al., 2000; RAMP et al., 2001, 2003), effektiv überwinden kann (CHINNAIYAN et al., 2000; GONG & ALMASAN, 2000; NAGANE et al., 2000, 2001; BELKA et al., 2001; DI PIETRO et al., 2001; KIM et al., 2001a; RAVI et al., 2001; FULDA & DEBATIN, 2006).

Bislang sind diverse Mechanismen für die verbesserte Wirkung einer kombinierten Behandlung von Zytostatika oder ionisierender Strahlung mit TRAIL beschrieben (Tab. 1.3): Hierzu zählen beispielsweise die Expressionsabnahme von anti-apoptotischen Faktoren wie c-FLIP, IAP, Bcl-2, Bcl-X_L und NF-κB, die Expressionszunahme von pro-apoptotischen Faktoren wie Bax, Bak und der Apoptose-induzierenden TRAIL-Todesrezeptoren DR4 und DR5 sowie die verstärkte Freisetzung des Cytochrom c. Aufgrund dieser Befunde wird das TRAIL-System als ein therapeutisch modulierbarer Signalweg der Zytostatika- und strahlungsinduzierten Apoptose angesehen und die ausgeprägte Therapieresistenz maligner Tumoren unter anderem durch Defekte in diesem Signalweg erklärt (FULDA & DEBATIN, 2006).

Mit Ausnahme von ersten analogen Beobachtungen an einzelnen Zelllinien (DEJOSEZ et al., 2000; RAMP et al., 2001, 2003; HEIKAUS et al., 2007) sind die molekularen Mechanismen, welche die Sensitivität und die Resistenz des humanen Nierenzellkarzinoms gegenüber einer TRAIL- oder Zytostatika-induzierten Apoptose regulieren, bislang nur unvollständig verstanden. Systematische Untersuchungen zur Frage, ob eine gestörte Aktivierung des TRAIL-Systems auch für die außerordentliche Strahlungsresistenz dieses malignen Tumors von Bedeutung sein könnte, liegen bislang nicht vor.

1.10 Ziel der Arbeit

Apoptose ist ein physiologischer Prozess, der in mehrzelligen Organismen unter anderem für die Entwicklung und Differenzierung von zentraler Bedeutung ist. Darüber hinaus stellt Apoptose das Gegengewicht zur Zellproliferation dar und trägt somit zum Erhalt der Gewebemöostase bei. In Tumorzellen ist das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Apoptose grundlegend gestört, was insbesondere auf eine gesteigerte Expression anti-apoptotischer Proteine oder einen Funktionsverlust pro-apoptotischer Proteine zurückzuführen ist. Zudem tragen Störungen der Apoptose-Regulation wesentlich zur Resistenz von Tumorzellen gegenüber Strahlen- und Chemotherapie bei.

Sowohl für die Aufklärung der Tumorphagenese als auch im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapiekonzepte ist jedoch zunächst ein besseres Verständnis der molekularen Apoptose-Mechanismen erforderlich. Insbesondere im humanen Nierenzellkarzinom, das sich durch eine weitgehende Resistenz gegenüber einer Apoptose-Induktion durch Zytostatika oder ionisierende Strahlung auszeichnet, sind diesbezüglich noch viele Fragen offen oder nur unvollständig beantwortet.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist daher die Untersuchung der im humanen Nierenzellkarzinom vorliegenden Regulationsstörungen der durch TRAIL, Zytostatika und Gamma-Strahlung induzierten Apoptose unter den kontrollierten experimentellen Bedingungen eines *in vitro* Tumormodells.

Die Analyse erfolgte insbesondere im Hinblick auf die Klärung der folgenden **Fragen**:

1. Könnte die Resistenz des humanen Nierenzellkarzinoms gegenüber Zytostatika- oder TRAIL-induzierter Apoptose unmittelbar auf eine differentielle Expression Apoptose-relevanter Genen zurückzuführen sein?
2. Könnte eine kombinatorische Behandlung von TRAIL mit ionisierender Gamma-Strahlung tatsächlich die Apoptoseresistenz dieses malignen Tumors überwinden und auf diese Weise eine therapeutische Option darstellen?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden 8 neu etablierte permanente Zelllinien untersucht, die sich vom klarzelligen Nierenzellkarzinom ableiten und zu dem häufigsten Subtyp des humanen Nierenzellkarzinoms gehören.

2 Material

2.1 Zelllinien

Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen waren 8 Nierenkarzinomzelllinien, die aus Primärtumoren der Niere isoliert wurden, nach THOENES et al. (1986) dem klarzelligen (clearCa) histologischen Subtyp des Nierenzellkarzinoms zugeordnet wurden (GERHARZ et al., 1993, 1994) und bezüglich ihres *p53*-Mutationstatus charakterisiert wurden (RAMP et al., 2000). In Tabelle 2.1 sind die verwendeten Nierenkarzinomzelllinien aufgeführt.

Die in der vorliegenden Arbeit als Kontrolle verwendete humane Zelllinie Jurkat J16 wurde freundlicherweise von Herrn. Prof. Dr. Peter H. Krammer (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Jurkat J16 leitet sich von der T-Zell-akuten lymphoblastischen Leukämie (T-ALL) ab, einer akuten Leukämie, die von bösartig entarteten Vorläuferzellen der T-Lymphozyten ausgeht.

Tab. 2.1: Übersicht der verwendeten humanen Nierenkarzinomzelllinien

ZELLINIE (clearCa-)	<i>p53</i> -MUTATIONSSTATUS
2	MT in der nicht-kodierenden Region: Codon 306:CGA (Arg) → CAA (Gln)
4	MT im Exon 8: Codon 273:CGA (Arg) → CAT (His)
6	MT im Exon 8: Codon 290:CGC (Arg) → CAC (His)
7	WT
14	WT
20	WT
22	MT in der nicht-kodierenden Region: Codon 331:CTT (Glu) → CTC (His)
23	WT

Abkürzungen: WT: Wildtyp, MT: Mutation

2.2 Chemikalien

Alle Flüssigkeiten und Feststoffchemikalien mit dem Reinheitsgrad *pro Analysis* (p.A.) wurden falls nicht anderweitig gekennzeichnet von den Firmen Gibco (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Carl Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Seelze) bezogen.

2.3 Zytostatika, Zytokine, Apoptose-Induktoren und Bestrahlung

Tab. 2.2: Verwendete Zytostatika, Zytokine, Apoptose-Induktoren und Bestrahlung

SUBSTANZ	BEZUGSQUELLE	LÖSUNGSMITTEL	STOCKLÖSUNG	ARBEITSKONZENTRATION
Topotecan ^a	Smith Kline Beecham, München	PBS	2 mg/ml	100 ng/ml
TRAIL ^b	PeproTech, Hamburg	PBS	100 ng/μl	10-100 ng/ml
CH11 ^c	Immunotech, Hamburg	PBS/Glycerol	500 ng/μl	500 ng/ml
BESTRAHLUNG	BEZUGSQUELLE			Dosis
Gamma-Strahlung	Radiologie, Universitätsklinikum, Düsseldorf (Prof. Dr. Mödder)			1-5 Gy

(a) Hycamtin[®], (b) recombinant human soluble rhs-TRAIL, (c) CD95-agonistischer Antikörper

2.4 Nukleinsäuren

2.4.1 DNA-Längenstandards

Tab. 2.3: Liste der verwendeten DNA-Längenstandards

NAME	BEZUGSQUELLE	FRAGMENTLÄNGE (BP)
100 Bp DNA-Leiter	Gibco, Karlsruhe	100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 2072; 1 µg/µl
1Kb DNA-Leiter	Gibco, Karlsruhe	75, 134, 154, 201, 220, 298, 344, 396, 506, 517, 1018, 1636, 2036, 3054, 4072, 5090, 6108, 7126, 8144, 9162, 10180, 11198, 12216; 1 µg/µl

2.4.2 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide (Primer) wurden als HPLC-gereinigte Lyophilisate von der Firma MWG (Ebersberg) bezogen. Die "sense" und "anti-sense" Sequenzen der Primer mit jeweiligen Genbank-Accession-Nummern der entsprechenden Gene bzw. cDNA/mRNA sind in der nachfolgenden Tabelle 2.4 aufgeführt.

Tab. 2.4: Liste der verwendeten Oligonukleotide (Primer)

PRIMER	SEQUENZ (5'→3')	GENE (cDNA/mRNA)	GENBANK-ACC.-NR
<i>E2F1</i> -sense	CGG CGG ACG GCT TGA GGG GTT GAC	<i>E2F1</i>	M96577
<i>E2F1</i> -antisense	TCG TGG GGT GGG GAA AGG CTG ATG		
<i>GADD45</i> -sense	AAG GGG CTG AGT GAG TTC AA	<i>GADD45</i>	M60974
<i>GADD45</i> -antisense	TTT TCC TTC CTG CAT GGT TC		
<i>p21</i> -sense	CAG TGG ACA GCG AGC AGC TG	<i>P21</i>	U09579
<i>p21</i> -antisense	ATC TGT CAT GCT GGT CTG CC		
<i>APAF-1</i> -sense	CCG GGC AAA AGG GAT AGA ACC C	<i>APAF-1</i>	AF013263
<i>APAF-1</i> -antisense	GCA CTG CCG GGA CAA GAC TGG		
<i>Caspase-9</i> -sense	GCC CTG TGT CGG TCG AGA AGA TTG	<i>CASP9</i>	U60521
<i>Caspase-9</i> -antisense	CTC GGG GTT ACT GCC AGG GGA CTC		
<i>CDC25A</i> -sense	AGA ACT CTG CCC AGC TCG GAA TG	<i>CDC25A</i>	M81933
<i>CDC25A</i> -antisense	GGG GGA AGA TGC CAG GGA TAA AG		
<i>NIK</i> -sense	CAG GTA TGC CCG CCC GTA GGT TA	<i>NIK</i>	Y10256
<i>NIK</i> -antisense	CCA GGG GCA GGG CAG GGT GAG T		
<i>BCL-2A1</i> -sense	CCA CCA GGC AGA AGA TGA CAG A	<i>BCL2A1</i>	U29680
<i>BCL-2A1</i> -antisense	CCA GCC TCC GTT TTG CCT TAT		
<i>Smac/DIABLO</i> -sense	AGC TGG AAA CCA CTT GGA TG	<i>DIABLO</i>	AF262240
<i>Smac/DIABLO</i> -antisense	CCA GCT TGG TTT CTG CTT TC		
<i>HPRT1</i> -sense	CGC CTC CGC CTC CTC CTC T	<i>HPRT1</i>	M31642 (V00530)
<i>HPRT1</i> -antisense	TCC CAT CTC CTT CAT CAC ATC TCG		

2.5 Proteine

2.5.1 Protein-Molekulargewichtsstandards

Tab. 2.5: Verwendete Protein-Molekulargewichtsstandards

NAME	BEZUGSQUELLE	MOLEKULARGEWICHT (KDA)
Low Range	Bio-Rad, München	6.5, 14.4, 21.5, 31.0, 45.0, 66.2, 97.4
Broad Range	Bio-Rad, München	6.5, 14.5, 21.5, 31, 45, 66, 97.4, 116, 200

2.5.2 Enzyme und Enzyminhibitoren

Tab. 2.6: Verwendete Enzyme

ENZYM	BEZUGSQUELLE
AMV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Klenow-Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Promega, Mannheim oder Qiagen, Hilden
RNasin Ribonuclease Inhibitor	Promega, Mannheim

2.5.3 Antikörper

2.5.3.1 Primärantikörper

Tab. 2.7: Liste der verwendeten Primärantikörper

ANTIKÖRPER	KLON	BESCHREIBUNG	BEZUGSQUELLE	VERDÜNNUNG
PARP	4C10-5	Monoklonal, Maus	Pharmingen, San Diego, USA	1:1000
Caspase-3		Polyklonal, Kaninchen	Cell Signaling Technology, Beverly, USA	1:150
Caspase-6		Polyklonal, Kaninchen	Cell Signaling Technology, Beverly, USA	1:1000
Caspase-7	B94-1	Monoklonal, Maus	Pharmingen, San Diego, USA	1:1000
Caspase-8	1C12	Monoklonal, Maus	Cell Signaling Technology, Beverly, USA	1:1000
Caspase-9	1-2	Monoklonal, Maus	Oncogene, La Jolla, USA	1:500
c-FLIP	NF6	Monoklonal, Maus	Prof. Dr. Krammer, DKFZ, Heidelberg	1:10
FADD	A66-2	Monoklonal, Maus	Pharmingen, San Diego, USA	1:1000
Bid		Polyklonal, Kaninchen	Biosource, Camarillo, USA	1:500
Phospho-Akt	4E2	Monoklonal, Maus	Cell Signaling Technology, Beverly, USA	1:1000
XIAP	48	Monoklonal, Maus	Transduction Laboratoires Lexington, USA	1:250
Survivin		Polyklonal, Kaninchen	Novus Biologicals, Littleton, USA	1:1000
α -Tubulin	B-5-1-2	Monoklonal, Maus	Sigma-Aldrich, Seelze	1:5000

2.5.3.2 Sekundärantikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase, HRP)-gekoppelten HRP-Anti-Maus (Ursprungspezies: Schaf, Isotyp: IgG) und HRP-Anti-Kaninchen (Ursprungspezies: Affe, Isotyp: IgG) Sekundärantikörper wurden von der Firma Amersham Life Technologies (Freiburg) bezogen und 1:5000 (HRP-Anti-Maus) bzw. 1:3000 (HRP-Anti-Kaninchen) eingesetzt.

2.6 Molekularbiologische Kits

Tab. 2.8: Liste der verwendeten molekularbiologischen Kits

KIT	BEZUGSQUELLE
BD Atlas™ Human Apoptosis cDNA Expression Arrays	BD Biosciences Clontech (Palo Alto, USA)
BD Atlas™ Pure Total RNA Labelling System	BD Biosciences Clontech (Palo Alto, USA)
BigDye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Dye Ex 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden
Lumi-Light Western Blotting Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden
PCR Master Mix, 2x	Promega, Mannheim
Phototope® HRP Western Detection System	Cell Signaling Technology, Beverley, USA
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
pGEM-T Vector System I	Promega, Mannheim
Protein Assay	Bio-Rad, München
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder Homogenisator	Qiagen, Hilden
Rediprime DNA Labelling System	Amersham Life Technologies, Freiburg
Reverse Transcription Systems	Promega, Mannheim
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.7 Hilfsmittel

2.7.1 Plastikgefäße und Einwegartikel

Plastikgefäße wurden von den Firmen Becton-Dickinson (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg) und Nunc (Wiesbaden) bezogen. Polyallomer-Zentrifugenröhrchen und Einwegartikel wurden von den Firmen Beckman Coulter GmbH (Krefeld) und Gibco (Karlsruhe) bezogen. Microspin S-300 HR-Säulen wurden Pharmacia Biotech (Dübendorf) bezogen. Filterpapiere wurden von Whatman Schleicher & Schuell GmbH (Dassel) bezogen. Hybond N Membrane (N steht für Nylon) wurden von Amersham Life Technologies (Freiburg) bezogen.

2.7.2 Filmmaterial und Visualisierungsfolien

Lumi-Film Chemiluminescent Detection Filme von Roche Diagnostics (Mannheim) wurden zur Visualisierung von Signalen durch Chemolumineszenz verwendet. Kodak Biomax MS Filme von Sigma-Aldrich (Seelze) oder Fuji Image Folie von Fujifilm Germany (Düsseldorf) wurden zur Visualisierung von radioaktiven Signalen verwendet. Die Verstärkerfolien wurden von der Firma Fujifilm Germany (Düsseldorf) bezogen.

2.7.3 Geräte

Tab. 2.9: Liste der verwendeten Geräte

GERÄT	BEZUGSQUELLE
ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Axioskop	Carl Zeiss AG, Jena
Bestrahlungsgerät XK 5071 (⁶⁰ Co)	Radiologie, Universitätsklinikum, Düsseldorf
Biofuge 13 R	Heraeus, Hanau
Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg
Controlled Environment Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, Nürtingen
FUJI Film BAS-Cassette 2340	Fujifilm Germany, Düsseldorf
Gel Dryer Model 583	Bio-Rad, München
Gelelektrophoresekammer GNA 100	Pharmacia Biotech, Dübendorf
Gelelektrophoresekammer GNA 200	Pharmacia Biotech, Dübendorf
GenAmp PCR System 2400	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Hoefer SE 600 Series Electrophoresis Unit	Hoefer, Holliston, USA
Hoefer TE Series Transphor Electrophoresis Unit	Hoefer, Holliston, USA
Hydro Tech Vacuum Pump	Bio-Rad, München
Inkubationsroller CAT RM5	CAT M. Zipper GmbH, Staufen
Inversionsmikroskop DM IRB	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
J2 MC Ultrazentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
L8-M Ultrazentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Mini Hybridization Oven	Appligene, Heidelberg
pH-Meter 340	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Phosphoimager FLA-3000	BMFZ, Düsseldorf
Spectrocrosslinker XL-1000	Spectronics Corporation, Westbury, USA
Spektrophotometer DU 640	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Sterilbank NSF 49	Clean Air, Woerden, NL
Szintillationszähler	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
T1-Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen
Thermomixer Typ 5436	Eppendorf, Hamburg
Titertek Multiskan Plus ELISA Reader	Titertek, Huntsville, Alabama, USA
Ultra Turrax Homogenisator	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
UV-Transilluminator	Spectronics Corporation, Westbury, USA
Water-Jacketed Incubator 3250	Forma Scientific Inc., Ohio, USA
Zentrifuge Mikro 22 R	Hettich, Kirchlegern
Zentrifuge Universal 16 R	Hettich, Kirchlegern

2.7.4 Software und Server

Tab. 2.10: Übersicht der verwendeten Software und Server

SOFTWARE	
Lasergene DNASTar, Version 4.03	
Rytest BASReader 3.01	
Rytest Tina20 Densitometrie Software, Version 2.09g	
SERVER	ADRESSE
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung von humanen Zelllinien

In dieser Arbeit wurden adhärent wachsenden Nierenkarzinomzelllinien und die leukämische Suspensionszelllinie Jurkat J16 verwendet (vgl. 2.1). Die adhärent wachsenden Zellen wurden in der Regel mit 0,4 ml Nährmedium/cm² Kulturgefäßfläche und die Suspensionszellen mit 4 x 10⁵ Zellen pro ml Nährmedium kultiviert. Um eine Selektion und Synchronisation der Zellen zu vermeiden, wurden dabei die Zellen kontinuierlich in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten.

3.1.1.1 Kultivierung von Nierenkarzinomzelllinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Nierenkarzinomzelllinien sind aus Primärtumoren vom histologisch klarzelligen Nierenzellkarzinom etabliert und bezüglich des p53-Mutationsstatus charakterisiert worden (GERHARZ et al., 1993, 1994; RAMP et al., 2000). Die Zellen wurden in 25 cm² Nunclon Kulturgefäßflächen (Gibco, Karlsruhe) in einem Brutschrank (Forma Scientific Inc., Ohio, USA) bei 37°C und einer Atmosphäre von 5% (v/v) CO₂ in folgendem Nährmedium kultiviert:

DMEM-Medium (500 ml) ergänzt mit:

- 10% (v/v) FBS (nicht Hitze-inaktiviert)
- 2 mM Glutamin
- 200 mg/L Arginin
- 72 mg/L Asparagin
- 10 mM HEPES, pH 7,4
- 100 U/ml Penicillin
- 100 µg Streptomycin

Das Ablösen adhärent-wachsender Zellen von Nierenkarzinomzelllinien zum Passagieren oder Ernten wurde die Zellkultur für 5-10 Minuten mit 20-50 µl/cm² PBS versetzt mit 0,05% (v/v) EDTA (Gibco, Karlsruhe) oder für 30-60 Sekunden mit 20-50 µl/cm² PBS versetzt 0,05% (v/v) EDTA (Gibco, Karlsruhe) und 10% (v/v) Trypsin (Sigma, Seelze) inkubiert.

3.1.1.2 Kultivierung sonstiger Zelllinien

Die Zellen der leukämischen Suspensionszelllinie Jurkat J16 wurden in den Western Blot Analysen als Kontrolle verwendet. Die Jurkat J16 Zellen wurden bei 37°C und einer Atmosphäre von 5% (v/v) CO₂ in folgender Nährlösung kultiviert:

RPMI-Medium (500 ml) ergänzt mit:

- 10% (v/v) FBS (Hitze-inaktiviert)
- 2 mM Glutamin
- 100 U/ml Penicillin
- 100 µg Streptomycin

3.1.2 Zellzahlbestimmung mit der "Neubauer-Zählkammer"

Die Zellzahl wurde durch lichtmikroskopisches Auszählen eines Aliquots der Zellsuspension - bei adhärennten Zellen nach Ablösen der Zellen vom Untergrund und bei Suspensionszellen direkt aus der Kultur entnommen - nach Färbung mit 0,2% (v/v) Trypanblau (Seromed Biochrom KG, Berlin) in einer Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim) ermittelt. Der Farbstoff färbt dabei aufgrund seiner Membranundurchlässigkeit lediglich tote Zellen blau an, während lebende weiß erscheinen. Die lebenden Zellen in allen 8 Eckquadraten der Neubauer-Zählkammer wurden gezählt und die Zellkonzentration der Zellsuspension mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl}_{\text{Susp.}} [\text{Zellen/ml}] = n/8 \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

"n" steht für die Menge an gezählten Zellen, 10^4 stellt den Kammerfaktor dar und der Verdünnungsfaktor ergibt sich durch die Zugabe des entsprechenden Volumens an Trypanblau oder PBS.

3.1.3 Behandlung von Säugerzellen mit Apoptose-Aktivatoren

Zur Induktion der Apoptose wurden die kultivierten Zellen nach 24 Stunden zweimal mit PBS gewaschen und schließlich mit den in Tabelle 2.2 aufgeführten Substanzen oder einer Gamma-Strahlung in der jeweils angegebenen Endkonzentration bzw. Bestrahlungsdosis behandelt. Zellen, die in frischen Nährmedien ohne Substanz-Zusatz inkubiert wurden oder nicht bestrahlt wurden, dienten als Kontrollen. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und auf die Untersuchung der Apoptose-Induktion hin weiter verarbeitet.

3.1.4 Erstellen von Wachstumskinetiken nach Induktion der Apoptose

Wachstumskinetiken von Zellen nach Exposition mit Apoptose-induzierenden Substanzen oder nach einer Bestrahlung mit Gamma-Strahlung wurden durch Bestimmung der Lebendzellzahl (3.1.2) erstellt.

Aus semikonfluent bewachsenen Kulturgefäßflächen (Gibco, Karlsruhe) wurden hierzu jeweils 1×10^4 Zellen in 100 μl Nährmedium pro "well" einer 24-well-Zellkulturplatte (Gibco, Karlsruhe) ausgesät und nach 24 Stunden - in 2 ml Medium - mit dem Zytostatikum Topotecan (100 ng/ml) oder dem rekombinanten humanen und löslichen (rhs) TRAIL-Liganden (100 ng/ml) exponiert und für 3, 6, 12, 15 und 24 Stunden weiter inkubiert. In einem weiteren Ansatz der Versuche wurden jeweils 5×10^4 Zellen in 100 μl Nährmedium pro "well" einer 24-well-Zellkulturplatte ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit ionisierender Gamma-Strahlung (1 oder 5 Gy) oder mit rhs-TRAIL (10 oder 100 ng/ml) alleine oder in Kombination behandelt und für weitere 72 Stunden inkubiert, wobei die für die Kombinationsbehandlung verwendete Endkonzentration von rhs-TRAIL 10 ng/ml betrug. Zum Zeitpunkt der Zellzahlbestimmung wurde die Lebendzellzahl lichtmikroskopisch mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die relativen Lebendzellzahlen (prozentual zur unbehandelten Kontrolle und Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten) der einzelnen Zeitpunkte wurden in einem Diagramm gegen die Inkubationszeit aufgetragen.

3.1.5 Statistische Analysen

Die statistische Signifikanz der Effekte von verwendeten Substanzen auf das Zellwachstum wurde mit Hilfe von T-Test beurteilt. Unterschiede bei einem p-Wert von $\leq 0,05$ waren demnach statistisch signifikant. Kombinatorische Wechselwirkungen von rhs-TRAIL und ionisierender Gamma-Strahlung wurden nach der Methode der partiellen Inhibition wie folgt ermittelt: Ausgedrückt als partielle Inhibition der Zellviabilität ist die von beiden Inhibitoren (i) erzeugte Inhibition additiv, wenn $i_{(1,2)} = i_1 + i_2$ oder liegt ein Synergismus vor, wenn $i_{(1,2)} > i_1 + i_2$ bzw. antagonistisch, wenn $i_{(1,2)} < i_1 + i_2$ (WEBB, 1963).

3.1.6 Morphologischer Nachweis der Apoptose durch HE-Färbung

Die HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin) ist ein sehr verbreitetes Färbeverfahren für histologische Schnitte und Zellkulturpräparate. Parallel zur Hämatoxylin-Färbung (Zellkernfärbung) wird meist eine Gegenfärbung mit einem kontrastreichen Zytoplasmafarbstoff (wie z.B. Eosin) durchgeführt. Hierbei erscheinen Zellkerne im Regelfall dunkelblau, während die anderen Zellbestandteile rosa eingefärbt werden.

Die morphologischen Merkmale der Apoptose (wie z.B. Chromatinkondensation, Zytoplasmaschrumpfung etc.) wurden anhand der HE-Färbung nachgewiesen. Hierzu wurden jeweils 1×10^4 Zellen aus semikonfluent bewachsenen Kulturgefäßflächen (Gibco, Karlsruhe) in 100 μ l Medium pro "well" einer 8-well-"chamber slides" (Nunc, Wiesbaden) ausgesät und nach 24 Stunden - in 1 ml Medium - mit Topotecan (100 ng/ml) oder rhs-TRAIL (100 ng/ml) exponiert und für 48 Stunden weiter inkubiert. Danach wurden die Zellen für die HE-Färbung fixiert. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 5 Minuten mit eiskaltem Methanol p.A., 30 Sekunden mit eiskaltem Aceton p.A. behandelt und an der Luft trocknen gelassen. Die Zellen wurden nacheinander mit Xylol p.A. (2 x 10 Minuten), 100%, 96% und 70%igem Alkohol p.A. (2 x 5 Minuten) und mit Hämatoxylin behandelt. Nach 10-minütigem Waschen mit fließendem Wasser und Inkubation mit Eosin 70%, 96%, 100%igem Alkohol und Xylol wurden die erwähnten charakteristischen morphologischen Merkmale der Apoptose anhand der lichtmikroskopischen Beobachtung der HE-gefärbten Zellen nachgewiesen und durch photographische Aufnahmen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dokumentiert.

3.1.7 Herstellung von Zellsedimenten aus eukaryotischen Zellen

Aus semikonfluent bewachsenen Kulturgefäßflächen (Gibco, Karlsruhe) wurden jeweils $5 - 7 \times 10^7$ Zellen erneut in Kulturgefäßflaschen mit Nährmedium kultiviert und nach 24 Stunden mit Topotecan (100 ng/ml) oder rhs-TRAIL (100 ng/ml) exponiert. Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden (rhs-TRAIL) oder 24 Stunden (Topotecan) wurden die Zellen mit 0,05% EDTA in PBS abgelöst und in 50 ml Falcon Röhrchen durch Zentrifugation mit $300 \times g$ für 5 Minuten bei Raumtemperatur geerntet. Die Zellen wurden hierfür in PBS resuspendiert und erneut bei $300 \times g$ abzentrifugiert. Die durch anschließende Dekantierung des Überstandes hergestellten Zellsedimente wurden direkt lysiert oder bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

3.1.8 Herstellung von Proteinextrakten aus eukaryotischen Zellen

Aus semikonfluent bewachsenen Kulturgefäßflächen (Gibco, Karlsruhe) wurden jeweils 1×10^6 Zellen erneut in Kulturgefäßflaschen mit Nährmedium kultiviert. Die adhärent wachsenden Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation mit rhs-TRAIL (10 ng/ml) und/oder ionisierender Gamma-Strahlung (1 Gy) exponiert und für 0,5, 3, 6, 12 und 24 Stunden weiter inkubiert. Nach einer jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, um eine Verunreinigung der Proteinlysate durch Reste von Medium und dem darin enthaltenen FBS zu verhindern. Die zuvor mit 0,05% EDTA in PBS abgelösten adhärent wachsenden Zellen und die Suspensionszellen wurden anschließend in 15 ml Falcon-Röhrchen durch Zentrifugation mit $300 \times g$ für 5 Minuten bei Raumtemperatur geerntet, die Zellen in PBS resuspendiert und erneut bei $300 \times g$ abzentrifugiert. Nach Dekantierung des Überstandes wurde das Zellsediment abhängig von der Zellmenge in 200-300 μ l des Protein-Lysepuffers [100 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl, pH 7,6; 1mM EDTA, pH 8,0; 1 mg/ml Aprotinin; 100 mg/ml Phenylmethylsulphonylfluorid; 1% Nonidet P40] resuspendiert und für 20 Minuten im Eisbad bei 0°C inkubiert. Durch Zentrifugation der Lysate mit $20000 \times g$ für 20 Minuten bei 4°C wurden restliche Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand wurde als Proteinfraction gewertet, in ein anderes Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

3.1.9 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

3.1.9.1 RNA-Präparationen nach der Guanidiniumisothiocyanat-Methode

Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde über die Guanidiniumisothiocyanat (GITC)-Methode nach dem Standardprotokoll (CHIRGWIN et al., 1979) durchgeführt. GITC gehört zu den chemischen Substanzen der Gruppe "chaotrope" Salze, welche die geordneten Wasserstoffbrückenbindungen in Wasser auflösen, indem sie die Wasserstruktur stören und so für die Zunahme der Entropie (ein Maß für die Unordnung in einem System) sorgen. Aufgrund der Tatsache, dass die treibende Kraft der Proteinfaltung die Zusammenlagerung der hydrophoben Aminosäuren im Wasser ist, verringern chaotrope Salze damit die hydrophoben Effekte bei Aminosäuren und wirken denaturierend auf Proteine, während Nukleinsäuren völlig intakt sind. Die Ultrazentrifugation in einem Caesiumchlorid-Dichtegradienten gewährleistet die optimale Auftrennung von Proteinen, DNA und RNA aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichten.

Auf dieser Grundlage wurden die kultivierten sedimentierten Zellen in 6,3 ml denaturierenden Lysepuffer von GITC (Sigma-Aldrich, Seelze) aufgenommen und durch Mischen homogenisiert. Nach Zugabe von 3 g Caesiumchlorid (Sigma-Aldrich, Seelze) erfolgte ein erneutes Mischen, dem sich eine Zentrifugation mit $200 \times g$ für 30 Sekunden anschloss. Daraufhin wurde eine Dichtegradientenultrazentrifugation durchgeführt, um die Zellbestandteile aufzutrennen. Hierzu wurden 3,6 ml der CsCl-Lösung in ein RNAse-freies Polyallomer-Röhrchen gefüllt und die zu lysierenden Zellen vorsichtig darüber geschichtet. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte mit $50000 \times g$ für 24 Stunden bei 25°C . Anschließend wurde die sedimentierte Gesamt-RNA in 400 μ l RNA-Aufnahmepuffer [10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 5mM EDTA; 1% (v/v) SDS] aufgenommen und mittels

Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion nach dem Standardprotokoll (CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987) gereinigt. Nach der Präzipitation durch eine Ethanol-Fällung wurde die Gesamt-RNA in 200 µl RNase-freiem DEPC-H₂O resuspendiert. Die Qualität der RNA wurde in einem denaturierendem Agarosegel nach elektrophoretischer Trennung (3.2.2.2) und Färbung mit Ethidiumbromid anhand der Integrität ihrer 28S- und 18S-Banden überprüft und auf einem UV-Transilluminator (Spectronics Corporation, Westbury, USA) mittels eines digitalen Bildverarbeitungssystems dokumentiert (Fröbel Labortechnik, Lindau). Die isolierte Gesamt-RNA wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

3.1.9.2 RNA-Präparationen mit dem RNeasy Mini Kit

Die kultivierten sedimentierten Zellen wurden mit Hilfe des QIAshredder Homogenisators nach Angaben des Herstellers homogenisiert (lysiert) (Qiagen, Hilden). Die Isolierung von Gesamt-RNA aus homogenisierten Zellen erfolgte unter Einsatz von Säulen und speziellen Puffern des Kits nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden). Bei dieser auf einem Säulen-Trennverfahren basierenden Methode handelt es sich die selektive Bindung der RNA an eine Membran und deren anschließende Elution unter speziellen Puffer- und pH-Bedingungen. Die mit RNase-freiem DEPC-H₂O [0,1% (v/v)] eluierte RNA wurde nach photometrischer Bestimmung der Konzentration oder bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

3.2 Nukleinsäuren

3.2.1 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Die Konzentrationen von RNA- und DNA-Lösungen wurden durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge (λ) von 260 nm bzw. 280 nm photometrisch bestimmt, wobei der Messwert für eine Absorption von 1.0 bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA/ml und 40 µg einzelsträngiger RNA/ml oder 33 µg einzelsträngiger DNA/ml entspricht (SAMBROOK et al., 1989).

Die Reinheit der RNA und DNA wurde durch zusätzliche Messungen bei einer Wellenlänge von 280 nm und anhand des Quotienten der Messwerte von 280 nm zu 260 nm ermittelt, der zwischen 1.8 und 2.0 betrug und somit einer höchsten Reinheit entsprach (SAMBROOK et al., 1989).

3.2.2 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

3.2.2.1 Native Agarose-Gelelektrophorese

Die Überprüfung der PCR-Amplifikate erfolgte je nach ihrer Größe (Basenpaaranzahl) in 1-3%igen horizontalen Agarosegelen.

Hierzu wurde die Agarose (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) in 1 x TBE-Puffer [90 mM Tris/Borsäure, pH 8,0; 90 mM Borsäure; 2 mM EDTA] gelöst, aufgeköcht und nach Abkühlung auf

ca. 40°C in einer entsprechenden Kammer geliert. Die PCR-Amplifikate oder DNA-Fragmente wurden in einem 6:1 Volumenverhältnis mit DNA-Ladepuffer [6xDNA-Ladepuffer: 125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 2% (w/v) SDS; 0,02% (w/v) Bromphenolblau; 20 µg/ml RNase A; 500 µg/ml Proteinase K] gemischt und aufgetragen. Je nach der zu untersuchenden DNA-Größe wurde als Größenstandard eine DNA-Leiter von 100 Bp oder 1 Kb (Tab. 2.3) mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80-100 V in 1 x TBE für 2-3 Stunden. Anschließend wurden die Agarosegele für 20 Minuten in einem Ethidiumbromidbad [0,5 µg/ml Ethidiumbromid in 1 x TBE] gefärbt und auf einem UV-Transilluminator (Spectronics Corporation (Westbury, USA) photographisch dokumentiert (Fröbel Labortechnik, Lindau).

3.2.2.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung isolierter Gesamt-RNA zur Überprüfung ihrer Integrität und zum anschließenden Transfer auf eine Hybond N Membran (Amersham Life Technologies, Freiburg) erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in 1,2%igen Agarose-Formaldehyd-Gelen.

Hierzu wurden jeweils 20 µg Gesamt-RNA mit RNA-Ladepuffer (5xRNA-Ladepuffer: 80 mM MOPS, pH 7,0; 20 mM Natriumacetat; 4 mM EDTA; 20% (v/v) Glycerin; 14% (v/v) Formaldehyd; 30% Formamid; 0,1% (w/v) Bromphenolblau] Probenpuffer gemischt, 10 Minuten bei 65°C erhitzt und anschließend elektrophoretisch bei einer Spannung von 75 V über 4 bis 5 Stunden aufgetrennt. Dabei diente FA [20 mM MOPS; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA] als Laufpuffer - versetzt mit 7,4% (v/v) Formaldehyd, um die Rückbildung von Sekundärstrukturen der RNA während der Elektrophorese zu unterbinden. Nach der Gelelektrophorese erfolgte die Überprüfung des gleichmäßigen Auftragens der RNA unter UV-Licht sowie die photographische Dokumentation (Fröbel Labortechnik, Lindau).

3.2.2.3 Extraktionen von DNA aus Agarose-Gelen

Zur Überprüfung der jeweiligen PCR-Amplifikate wurden nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung unter UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$) aus dem Gel herausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraktion Kits nach den Vorschriften des Herstellers (Qiagen, Hilden) eluiert.

3.2.3 cDNA-Synthese durch genspezifische Reverse Transkription

Die Reverse Transkription (RT) der Gesamt-RNA diente zur Herstellung der cDNA für die PCR-Analysen. Die Reaktion der Reversen Transkription erfolgte mit Hilfe des Reverse Transcription System (Promega, Mannheim) nach den Anweisungen des Herstellers.

Hierzu wurde 1 µg der Gesamt-RNA wurde durch Inkubation für 10 Minuten bei 70°C denaturiert. Die denaturierte Gesamt-RNA wurde schnell durch Zentrifugation sedimentiert und bis zur Durchführung der Reversen Transkription bei 4°C inkubiert. Die Reverse Transkription wurde nach folgendem Reaktionsansatz durchgeführt.

Reaktionsansatz zur Reversen Transkription

MgCl ₂ , 25 mM	4 µl
Reverse Transkriptase Puffer (10x konzentriert)	2 µl
dNTP-Mix, 10 mM	2 µl
RNasin (Ribonuclease Inhibitor)	0,5 µl
AMV Reverse Transkriptase (hoch konzentriert)	15 U
Oligo(dT) ₁₅ -Primer	0,5 µg
Gesamt-RNA	1 µg
RNAse freies H ₂ O	ad 20 µl

MgCl₂ diene als Kofaktor für die AMV Reverse Transkriptase (Avian Myeloblastosis Virus) und der Reverse Transkriptase Puffer zur Optimierung der Reaktionsbedingungen der Transkriptase. Der für die Primerverlängerung notwendige dNTP-Mix setzt sich aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP von jeweils 250 µM zusammen. Die Reverse Transkriptase AMV synthetisiert Einzelstrang-cDNA aus Gesamt-RNA sowie aus poly(A)⁺-isolierter RNA. Der Einsatz von Oligo(dT)₁₅-Primern gewährleistet, dass die Reverse Transkription an der 3'-poly(A)-Region gestartet wird. RNasin ist ein Ribonuklease-Inhibitor, der mögliche im Reaktionsansatz befindliche RNasen inaktiviert. Die Synthese der cDNA durch Reverse Transkription erfolgte nach folgendem Standardprogramm:

Standardprogramm zur cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

1.	42°C	50 min	Primerverlängerung (Extension)
	↓		
2.	95°C	5 min	Denaturierung der AMV
	↓		
3.	4°C	> 0 min	Kühlung nach Beendigung der Reaktion

3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene PCR-Techniken (Polymerase Chain Reaction) eingesetzt, um cDNA zu amplifizieren, oder definierte DNA-Bereiche zu sequenzieren. Alle konventionellen PCR-Reaktionen wurden mit Hilfe des T1-Thermocyclers (Biometra, Göttingen) oder des GeneAmp PCR Systems 2400 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt.

3.2.4.1 Konventionelle Amplifikationen von Gensequenzen aus cDNA (RT-PCR)

Zur Untersuchung der Genexpression wurden konventionelle PCR-Reaktionen durchgeführt, in denen cDNA als "Template" diene. Die konventionelle Amplifikation von Gensequenzen aus cDNA wurde mit Hilfe des "ready-to-use" PCR Master Mix, 2x (Promega, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und erfolgte nach folgendem Reaktionsansatz, wobei die in Tabelle 2.4 aufgeführten sequenzspezifischen Oligonukleotide als "sense" und "antisense" Primer dienten:

Reaktionsansatz zur Amplifikation von Gensequenzen aus cDNA durch PCR

PCR Master Mix, 2x	25 µl
Primer 1 ("sense"), 10 µM	0,5-5,0 µl
Primer 2 ("antisense"), 10 µM	0,5-5,0 µl
cDNA-Template ^(A,B)	5-10 µl
Nuklease-freies H ₂ O	ad 50 µl

^(A)die mittels RT-PCR-synthetisierte cDNA; ^(B)Zum Ausschluss von Kontaminationen mit Fremd-DNA wurde bei jeder PCR-Versuchsreihe eine Negativkontrolle ohne Zusatz von cDNA mitgeführt.

Der PCR Master Mix, 2x setzt sich aus dem *Taq* DNA-Polymerase (50 U/ml) des Bakteriums *Thermus aquaticus*, dem PCR-Puffer (pH 8,5), dem dNTP-Mix [400 µM/dNTP] und MgCl₂ [3 mM] sowie dem Nuklease-freien H₂O zusammen. Mit einer Halbwertszeit von ca. 9 Minuten bei 97,5°C ist die *Taq* DNA Polymerase auch bei hohen Temperaturen noch sehr stabil und wird hauptsächlich zur DNA-Amplifikation eingesetzt. Der Mix ist eine optimierte Mischung, die eine effiziente Amplifikation der DNA in einer Länge von 200-2000 Bp gewährleistet. Primer 1 bzw. 2 definieren die jeweilige Zielsequenz der DNA für die Gene *E2F1*, *GADD45*, *p21*, *APAF-1*, *Caspase-9*, *CDC25A*, *NIK*, *BCL-2A1*, *Smac/DIABLO* und *HPRT1* (vgl. Tab. 2.4). Die Amplifikationen der Gensequenzen aus cDNA wurden nach folgendem Standardprogramm durchgeführt:

Standardprogramm zur Amplifikation von Gensequenzen aus cDNA durch PCR

	1.	95°C	5 min	Prädenaturierung
	↓			
	2.	95°C	1 min	Denaturierung
	↓			
	3.	52°C ^(B) - 58°C	30 s ^(C) , 45 s bzw. 1 min	Primerbindung (Annealing)
	4.	72°C	1 min	Primerverlängerung (Elongation)
	↓			
	5.	4°C	> 1 min	Kühlung nach Beendigung der Reaktion

^(A)Amplifikationszyklen: 35 (*BCL-2A1*, *Caspase-9*, *CDC25A*, *E2F1*, *GADD45*, *HPRT1*, *NIK*, *p21*, *Smac/DIABLO*), 40 (*APAF-1*); ^(B)Primerbindungstemperatur (°C): 52 (*APAF-1*), 54 (*E2F1*, *CDC25A*, *HPRT1*), 56 (*Caspase-9*, *GADD45*, *Smac/DIABLO*), 57 (*BCL-2A1*), 58 (*NIK*, *p21*); ^(C)Primerbindungszeit: 30 s (*APAF-1*, *Caspase-9*, *CDC25A*, *HPRT1*, *p21*), 45 s (*BCL-2A1*, *E2F1*, *GADD45*), 1 min (*NIK*, *Smac/DIABLO*)

Zur Überprüfung der jeweiligen PCR-Amplifikate wurde von dem gesamten PCR-Ansatz zunächst eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt und das PCR-Produkt mit dem QIAquick Gel Ex-traktion Kit nach den Vorschriften des Herstellers (Qiagen, Hilden) eluiert. Anschließend wurden Sequenzanalysen durchgeführt.

3.2.4.2 Sequenzierung von DNA

Die jeweiligen PCR-Amplifikate sollten zu ihrer sicheren Identifizierung sequenziert werden. Hierzu wurden die Amplifikate mit Hilfe der Microspin S-300 HR-Säulen (Pharmacia Biotech, Dübendorf) von überschüssigen Primern getrennt und die DNA-Konzentration erneut photometrisch bestimmt (3.2.1). Die DNA-Sequenzanalyse wurden mit dem auf der Kettenabbruch-Methode basierenden BigDye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction Kit nach Angaben des Herstellers (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt und erfolgte nach folgendem Reaktionsansatz, wobei PCR-Amplifikate als Templates dienten:

Reaktionsansatz zur DNA-Sequenzierung

5 pmol/µl	"Sense"- oder "Anti-sense"-Primer
100 ng	PCR-Amplifikate (Templates)
2 µl	Terminator Ready Reaction Mix
ad 10 µl	H ₂ O

Der Terminator Ready Reaction Mix enthält AmpliTaq-Polymerase, Puffer, dNTPs sowie bei unterschiedlichen Wellenlängen fluoreszierende 2,3-didesoxy-NTPs (ddNTPs) und gewährleistet die Blockierung der weiteren Kettenverlängerung durch Einbau eines markierten didesoxy-Nukleotids mit Hilfe der PCR. So entstehen fluoreszierende Fragmente unterschiedlicher Länge, deren Farbkodierung von dem Sequenziergerät erkannt und analysiert werden kann. Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Standardprogramm durchgeführt:

Standardprogramm zur DNA-Sequenzierung durch



Das Diagramm zeigt einen kreisförmigen Prozess mit einem Pfeil, der im Uhrzeigersinn verläuft. In der Mitte des Kreises steht der Text '25 Zyklen'. Rechts neben dem Kreis ist eine Liste von fünf Schritten des PCR-Programms aufgeführt, die durch vertikale Pfeile verbunden sind.

1.	95°C	5 min	Prädenaturierung
	↓		
2.	95°C	10 s	Denaturierung
	↓		
3.	50°C	5 s	Primerbindung (Annealing)
	↓		
4.	60°C	4 min	Primerverlängerung (Elongation)
	↓		
5.	4°C	> 1 min	Kühlung nach Beendigung der Reaktion

Die nicht-eingebauten markierten didesoxy-Nukleotide wurden nach Beendigung der PCR-Reaktion mit Hilfe des Dye Ex 2.0 Spin Kits nach den Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) entfernt, anschließend in HPLC-Wasser (Millipore GmbH, Schwalbach) aufgenommen und mit einem Sequenziergerät, dem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, Weiterstadt), automatisch analysiert, wobei das Gerät Elektropherogramme erstellte. Die Auswertung der Diagramme und der Nukleinsäuresequenz erfolgte mit der Software Lasergene DNASTar, Version 4.03 sowie durch Identitätsvergleich mit der Datenbank über das BLAST-Programm.

3.2.5 cDNA-Microarray Analysen

In dieser Arbeit wurden cDNA-Microarray Analysen durchgeführt, um die Unterschiede in der Genexpression nachzuweisen, die durch eine Zytostatika- oder rhs-TRAIL-vermittelte Apoptose induziert wurden. Die Untersuchung der differentiellen Genexpression wurde unter Einsatz des BD Atlas Human Apoptosis cDNA Expression Array Systems nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA). Das verwendete Microarray System enthielt spezielle Nylon-Arraymembrane, auf denen jeweils 205 humane Apoptose-relevante Gene, 9 humane Haushaltsgene sowie Negativkontrollen und Kalibrierungsmarker als cDNA in Duplikat, bestehend aus kurzer sequenzspezifischer Oligonukleotide, immobilisiert waren.

3.2.5.1 Herstellung der markierten cDNAs für Microarray Analysen

Die Herstellung der radioaktiv markierten Sonden-cDNA aus Gesamt-RNA und die anschließende Aufreinigung erfolgte mit dem BD Atlas Pure Total RNA Labelling System nach Vorschriften des Herstellers (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA).

Hierzu wurden 5 µg (2 µl) der Gesamt-RNA mit 1 µl der mitgelieferten Apoptose-spezifischen 10x CDS-Primer-Mischung zusammengegeben und in einem vorgeheizten Thermoblock für jeweils 2 Minuten bei 70°C und 48°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 8 µl des zuvor nach Angaben des Herstellers hergestellten Mastermix [2 µl 5xReaktionspuffer: 1µl 10x dNTP-Mischung; 3,5 µl [α -³²P]dATP - 3000 Ci/mmol - 10 µCi/µl (Hartmann Analytik GmbH, Braunschweig); 0,5 µl 100 mM DTT; 1 µl MMLV Reverse Transkriptase - 50 U/µl; (Moloney Murine Leukemia Virus)] gemischt und für weitere 60 Minuten bei 48°C inkubiert. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte durch Zugabe des mitgelieferten 1 µl 10x Termination-Mix und Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde die radioaktiv markierte Sonden-cDNA durch Entfernung von nicht-eingebauten [α -³²P]dATPs und den kleinen cDNA-Fragmenten (< 100 Bp) mit Hilfe der mitgelieferten Komponente des BD Atlas Pure Total RNA Labelling Systems, welche auf einem säulen-chromatographischen Verfahren basieren, nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Anschließend wurde die Gesamt-Radioaktivität von radioaktiv markierter Sonden-cDNA mit einem Szintillationszähler (Beckman Coulter, Krefeld) bestimmt. Für die nachfolgenden Hybridisierungsversuche wurden ausschließlich die [α -³²P]dATP-markierten Sonden-cDNA-Proben eingesetzt, deren minimale Gesamt-Radioaktivität 10×10^6 cpm/ml (counts per minute: Zerfälle pro Minute) betrug. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung radioaktiv markierter Sonden-cDNA erfolgte bei -20°C.

3.2.5.2 Hybridisierung der markierten cDNAs auf Microarrays

Die Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden-cDNA mit der auf dem BD Atlas Human Apoptosis cDNA Expression-Arraymembran immobilisierten cDNA-Oligomere wurde mit Hilfe der mitgelieferten BD ExpressHyb Lösung nach den Vorschriften des Herstellers (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA) durchgeführt.

Hierzu wurde die BD Atlas Arraymembran mit einer Prähybridisierungsmischung [0,5 mg denaturierte Lachs-Spermien-DNA; 10 mg/ml (Sigma-Aldrich, Seelze); 5 ml BD ExpressHyb Lösung] für 30 Minuten bei 68°C im Hybridisierungsöfen (Appligene, Heidelberg) inkubiert. Anschließend wurde die Prähybridisierungsmischung mit der zuvor 5 Minuten bei 95°C inkubierten Hybridisierungsprobe (5 µl radioaktiv markierte Sonden-cDNA; 10×10^6 cpm/ml; 5 µl mitgelieferte C₀t-1 DNA) gemischt. Mit dieser Hybridisierungsmischung erfolgte eine erneute Inkubation der BD Atlas Arraymembran über Nacht bei 68°C im Hybridisierungsöfen (Appligene, Heidelberg). Nach Beendigung der Hybridisierungsreaktionen wurde die Arraymembran zur Entfernung unspezifisch gebundener DNA nach Angaben des Herstellers (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA) gewaschen. Hierzu wurde die Membran zunächst für 3 x 30 Minuten bei 68°C jeweils mit Lösung I [2 x SSC (20xSSS: 3 M Natriumchlorid; 300 mM Natriumacetat, pH 7,0); 1% SDS] und mit Lösung II [0,1 x SSC; 0,5% SDS] sowie für weitere 5 Minuten mit 2 x SSC bei Raumtemperatur gewaschen.

3.2.5.3 Signaldetektion und Datenanalyse von Microarrays

Die gewaschene Arraymembran wurde in eine Plastikfolie eingeschweißt und für 3-10 Tage mit einem Röntgenfilm in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie (Fujifilm Germany, Düsseldorf) bei

Raumtemperatur exponiert. Nach der Exposition wurden radioaktive cDNA-Signale mit dem Phosphorimager FLA-3000 (BMFZ, Düsseldorf) über die Software Ryttest BASReader detektiert und densitometrisch analysiert. Der Expressionsgrad für jede cDNA wurde als Mittelwert von beiden entsprechenden Signalwerten ermittelt. Das Ausmaß der Hintergrund-Expression wurde als Mittelwert von 10 zufällig gewählten Hintergrund-Signalen berechnet. Durch Abstrahieren der Hintergrund-Expression wurden die Ergebnisse der cDNA-Expression normiert. Die normierten Ergebnisse wurden gegenüber den cDNA-Signalen des Haushaltsgens *HPRT1* (Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase) abgeglichen und im Vergleich zur Kontrolle ausgewertet. Hierdurch konnten wie nachfolgend dargestellt den spezifischen cDNA-Signalen sowohl ein quantitativer relativer Expressionsgrad im Vergleich zur Kontrolle als auch eine entsprechende Farbcode zugeteilt werden. Die Ergebnisse des cDNA-Microarrays exemplarisch für die einzelnen Gene (vgl. Tab. 2.4) wurden mittels Northern Blot Analysen überprüft.

Relative Änderung und zugehörige Farbcode der cDNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle				
Abnahme < 0,5 fache	keine Änderung 0,5 – 1,5	Z 1,6 – 3 (gering)	u n a h m e 3,1 – 6 (mittelstark)	e > 6 (stark)

3.2.6 RNA-Transfer ("Northern Blot")

Das Funktionsprinzip der Methode "Northern Blot" basiert auf dem Elektrotransfer von RNA auf einen Träger (z.B. Nylonmembran) mit anschließender Hybridisierung der spezifischen Markierung von RNA-Sequenzen mit komplementären Sonden und deren Detektion (ALWINE et al., 1977; THOMAS, 1980).

Hierzu wurden jeweils 20 µg der Gesamt-RNA in einem denaturierenden 1,2%igen Agarose-Formaldehyd-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das gleichmäßige Aufragen der RNA wurde unter UV-Licht überprüft und dokumentiert (Fröbel Labortechnik, Lindau). Zum Transfer der aufgetrennten RNA aus dem Gel auf eine Nylonmembran wurde das Gel luftblasenfrei auf in 20 x SSC getränktes Filterpapier (Whatman Schleicher & Schuell GmbH, Dassel) gelegt, darauf eine Hybond N Nylonmembran (Amersham Life Technologies, Freiburg) ausgerollt und darüber erneut Filterpapier geschichtet. Der Aufbau stand in einer Wanne mit 20 x SSC, sodass die RNA durch den Kapillareffekt aus dem Gel herausgelöst und in die Nylonmembran transferiert werden konnte. Nach 24 bis 48 Stunden wurde die Vollständigkeit des Transfers unter UV-Licht geprüft. Anschließend erfolgte ein "UV-Crosslinking" mit einem UV-Crosslinker (Spectronics Corporation, Westbury, USA), um RNA auf der Nylonmembran zu immobilisieren.

3.2.6.1 Herstellung der markierten cDNAs für Northern Blot Analysen

Die radioaktive Markierung der generierten Sonden-cDNA mit [α -³²P]dCTP (Hartmann Analytik GmbH, Braunschweig) erfolgte mit Hilfe des Rediprime DNA Labelling Systems nach den Angaben des Herstellers (Amersham Life Technologies, Freiburg).

Hierzu wurden zunächst 100 ng der spezifischen Sonden-cDNA durch 10-minütige Inkubation bei 95°C in Einzelstränge denaturiert. Der eigentliche Oligolabeling-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen: 5 µl spezifische cDNA-Sonde (100 ng), 25 µl H₂O bidest, 10 µl Labelling-Puffer des Rediprime DNA Labelling Systems, 5 µl Primer, 2 µl Klenow-Polymerase (New England Biolabs GmbH, Frankfurt) und 3 µl [α -³²P]dCTP. Nach einer Inkubation von 60 Minuten bei 37°C wurde nicht inkorporiertes dCTP mit Hilfe des Nucleotide Removal Kits nach den Vorschriften des Herstellers (Qiagen, Hilden) entfernt, anschließend die Gesamt-Radioaktivität der markierten Sonden-cDNA mit einem Szintillationszähler (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) bestimmt.

3.2.6.2 Hybridisierung der markierten cDNAs auf Nylonmembranen

Um die unspezifischen Bindungen bei der Hybridisierung zu reduzieren, wurde die Hybond N Nylonmembran zunächst in einer Northern Blot Hybridisierungslösung [50% Formamid; 250 mM Na₂HPO₄, pH 7,2; 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0; 7% SDS; 2% 10 mg/ml Lachs-Spermien-DNA] bei 43°C für mindestens 4 Stunden im Hybridisierungssofen (Appligene, Heidelberg) inkubiert. Daraufhin wurde die Northern Blot Hybridisierungslösung gegen 10 ml der gleichen Lösung mit radioaktiv markierter Sonden-cDNA (Gesamtaktivität von 1 bis 2 x 10⁶ cpm/ml) ausgetauscht, die zuvor durch 5-minütiges Erhitzen bei 95°C denaturiert war. Nach 18-24-stündiger Inkubation im Hybridisierungssofen (Appligene, Heidelberg) bei 43°C wurde die Membran zur Elimination unspezifisch gebundener radioaktiver DNA zunächst dreimalig 15 Minuten bei 43°C mit NB Waschlösung 1 [2 x SSC; 0,1% SDS] und anschließend jeweils 20 Minuten mit NB Waschlösung 2 [0,1% SDS; 25 mM Na₂HPO₄, pH 7,2; 1 mM EDTA, pH 8,0] und NB Waschlösung 3 [1% SDS; 25 mM Na₂HPO₄, pH 7,2; 1 mM EDTA, pH 8,0] gewaschen. Danach wurde die Membran in eine Plastikfolie eingeschweißt und für 2-10 Tage mit einem Röntgenfilm in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie (Fujifilm Germany, Düsseldorf) bei -70°C exponiert. Daraufhin konnte die relative Bandengröße der Signale mittels zuvor auf der Membran markierten 28S- (4,9 Kb) und 18S (1,9 Kb) Banden der ribosomalen RNA ermittelt werden. Die Gleichheit der aufgetragenen RNA-Menge wurde durch die Untersuchung der mRNA-Expression des Haushaltsgens *HPRT1* (Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase) überprüft. Durch visuellen Vergleich der Schwärzung der spezifischen Banden konnten den RNA-Signalen ein semiquantitativer Expressionsgrad zugeteilt werden.

3.3 Proteine

3.3.1 Bestimmung von Protein-Konzentrationen

Die Proteinbestimmung wurde nach einer Methode von SEDMAK & GROSSBERG (1977) durchgeführt. Die Methode basiert prinzipiell auf der unspezifischen Anlagerung des Säurefarbstoffes Coomassie-Brillantblau G 250 an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten von Proteinen und wurde mit dem Protein-Assay Farbreagenz von Bio-Rad (München) durchgeführt. Eine Proteinlösung wurde dabei mit H₂O auf 800 µl aufgefüllt, bevor 200 µl Farbreagenz zugegeben wurden. Die Absorption bei 595 nm wurde in einem Spektralphotometer DU640 (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) gegen eine Referenz ohne Protein gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer Eichgeraden, erstellt mit 5 bis 20 µg BSA (Rinderserumalbumin), ermittelt.

3.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese ("PAGE")

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in denaturierenden diskontinuierlichen SDS-haltigen Polyacrylamid-Gelen nach einer Methode von LAEMMLI (1977), wobei abhängig vom Molekulargewicht von Proteinen 8- bis 12%ige Polyacrylamid-Trenngele mit 5%igen Sammelgelen überschichtet wurden. Alle Gelelektrophoresen wurden dabei in einem vertikalen System von Hoefer (Holliston, USA) durchgeführt. Molekulargewichtsbestimmungen erfolgten mit Hilfe des "prestained kaleidoscope" Low Range- oder Broad Range-Markers" von Bio-Rad (München). Nachfolgend ist die Zusammensetzung der einzelnen Komponenten dargestellt.

Komponenten der SDS-Polyacrylamid-Gele

	Trenngel	Sammelgel	WB-Elektrophoresepuffer		Protein-Gelladepuffer	
Acrylamid-Bisacrylamid-Mix (30%; 37,5:1)	12-15% (v/v)	5% (v/v)	25 mM	Tris	10 mM	Tris/HCl, pH 8,0
Tris/HCl, pH 8,8/6,8	400 mM (pH 8,8)	125 mM (pH 6,8)	192 mM	Glycin	1 mM	EDTA
SDS	0,1% (w/v)	0,1% (w/v)	0,1% (w/v)	SDS	12,5% (v/v)	Glycerin
TEMED	0,03% (v/v)	0,08% (v/v)	pH 8,3		2% (w/v)	SDS
APS	0,04% (w/v)	0,1% (w/v)			2% (v/v)	β-Mercaptoethanol
					0,01% (w/v)	Bromphenolblau

Jeweils 50 µg der Proteinproben wurden mit Protein-Gelladepuffer in einem 1:1 Verhältnis gemischt, 5 Minuten lang im Heizblock bei 95°C denaturiert, durch Vortexen resuspendiert, 30 Sekunden bei 20000 x g zentrifugiert und aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 150-200 V in WB Elektrophoresepuffer.

3.3.3 Proteintransfer ("Western Blot")

Analog zur RNA, basiert das Funktionsprinzip der Methode "Western Blot" auf dem Elektrotransfer von Proteinen ebenso auf einen Träger (z.B. Nitrocellulosemembran) mit anschließender Detektion (Radioaktivität oder Chemolumineszenz) (LOTTSPREICH & ZORBAS, 1998).

Der Elektrotransfer der elektrophoretisch in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran mit einer Porengröße von 0,45 µm (Whatman Schleicher & Schuell GmbH, Dassel) erfolgte für 1-2 Stunden in einer mit WB Transferpuffer [25 mM Tris/HCl, pH 7,5; 192 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol] gefüllten, gekühlten Transfer-Kammer von Hoefer (Holliston, USA) bei konstanter Spannung von 100 V zwischen zweimal zwei Lagen Filterpapier. Vor jenem Überführen wurden das ungefärbte Gel, das Filterpapier und die Nitrocellulosemembran in WB Transferpuffer getränkt. Die Effektivität des Transfers wurde durch eine reversible Proteinfärbung (gebrauchsfertige 0,2%ige Ponceau S-Lösung in 3% TCA von Serva, Heidelberg) auf der Nitrocellulosemembran überprüft. Danach wurden die Membrane zweimal für 10 Minuten mit WB Waschpuffer [10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,2% (v/v) Tween 20] gewaschen und zur Blockierung von freien, unspezifischen Bindestellen über Nacht bei 4°C mit WB-Blockierlösung [3% (w/v) non fat Milchpulver; 1% (w/v) BSA; gelöst in WB Waschpuffer] abgesättigt.

3.3.4 Immundetektion von Proteinen

Anschließend wurden die Nitrocellulosemembrane dreimal für 10 Minuten erneut mit WB Waschlösung gewaschen und mit dem Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung (vgl. Tab. 2.7) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit WB Waschlösung (für je 10 Minuten) wurde die Membran für 1 Stunde mit dem spezifischen Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper in einer 1:5000 (Anti-Maus) bzw. 1:3000 (Anti-Kaninchen) Verdünnung (ebenfalls in Blockierungspuffer) bei Raumtemperatur inkubiert und erneut dreimal für 10 Minuten mit WB Waschlösung gewaschen. Anschließend wurden je 2 ml der Detektionsreagenzien I + II aus dem Lumi-Light Western Blotting Kit der Firma Roche Diagnostics (Mannheim), das sich aus dem Luminol, dem Peroxidasesubstrat, und einem chemischen Lumineszenzverstärker zusammensetzt, direkt auf die Membran pipettiert und diese 1 Minute in der Lösung geschwenkt. Durch die Peroxidase (konjugiert mit dem Sekundärantikörper) wurde die Oxidation des Substrates Luminol katalysiert, welche in Anwesenheit eines chemischen Verstärkers eine Chemolumineszenz-Reaktion hervorrief, die durch Exposition auf einem Chemilumineszenz-Detection-Film (Roche Diagnostics, Mannheim) oder einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden konnte. Anhand der eingezeichneten Protein-Molekulargewichtsstandards konnte die Größe der Proteine nach deren Detektion abgeschätzt werden. Die Gleichheit der aufgetragenen Proteinmenge wurde durch die Inkubation der Membrane mit dem Primärantikörper α -Tubulin überprüft.

4 Ergebnisse

Humane Nierenzellkarzinome zeichnen sich durch außerordentliche Unterschiede in der Sensitivität sowohl gegenüber einer Zytostatika- oder strahlungsvermittelter Apoptose als auch gegenüber einer TRAIL-induzierten Apoptose aus. Die Ursachen dieser unterschiedlichen Apoptosesensitivität sind jedoch weitgehend unbekannt. Die bislang zum Nierenzellkarzinom vorliegenden Arbeiten zeigen eine Koexpression von TRAIL-Todesrezeptoren DR4 und DR5 sowie von TRAIL-Decoy-Rezeptoren DcR1 und DcR2 in den Nierenkarzinomzelllinien, wobei der DcR2-Rezeptor in den meisten der Zelllinien eine geringe Expression aufweist (RAMP et al., 2001). Nach heutiger Vorstellung sind jedoch die Unterschiede in der Apoptosesensitivität von malignen Tumoren, auch von Nierenzellkarzinomen (DEJOSEZ et al., 2000; RAMP et al., 2001, 2003; HEIKAUS et al., 2007), nicht auf eine unterschiedliche Koexpression von TRAIL-Rezeptoren zurückzuführen (DANIELS et al., 2005). Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit systematische *in vitro* Untersuchungen zu den Regulationsstörungen der Apoptose im Nierenzellkarzinom durchgeführt.

4.1 Untersuchungen zur differentiellen Genexpression bei Zytostatika- oder TRAIL-induzierter Apoptose im humanen Nierenzellkarzinom

4.1.1 Heterogene Apoptosesensitivität von Nierenkarzinomzelllinien

Um die Unterschiede in der Sensitivität gegenüber einer Zytostatika- oder TRAIL-induzierten Apoptose zu quantifizieren, wurde die Nierenkarzinomzelllinie clearCa-6 und clearCa-7 mit dem Zytostatikum Topotecan (100 ng/ml) oder dem rekombinanten löslichen humanen TRAIL-Liganden (rhs-TRAIL) (100 ng/ml) für 3, 6, 12, 15 und 24 Stunden exponiert und die Zellzahl anhand einer lichtmikroskopischen Auszählung der lebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt. So zeigte sich in clearCa-6 eine signifikante ($p < 0,05$) Reduktion der Zellzahl nach Exposition mit Topotecan oder rhs-TRAIL (Zellzahl nach 24 Stunden in % der Kontrolle: Topotecan: $43,6 \pm 2,5\%$; TRAIL: $20,4 \pm 2,6\%$; Abb. 4.1).

Darüber hinaus ergaben die lichtmikroskopischen Analysen der HE-gefärbten Zellen, dass die Abnahme der Zellzahl in clearCa-6 mit einer deutlichen Induktion der Apoptose einherging (Abb. 4.2c und e). Dagegen resultierte die Exposition der Zelllinie clearCa-7 mit Topotecan lediglich in einer geringen Abnahme der Zellzahl. Die Exposition mit rhs-TRAIL steigerte gleichmäßig leicht die Zellzahl in clearCa-7 (Abb. 4.1). Die Untersuchung der HE-gefärbten Zellen zeigte keine Induktion der Apoptose in clearCa-7 nach Exposition mit Topotecan oder TRAIL (Abb. 4.2d und f). Diese Beobachtung demonstriert die Resistenz von clearCa-7 gegenüber einer Topotecan- oder TRAIL-vermittelten Apoptose.

Insgesamt lassen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen eine sensitive (clearCa-6) und eine resistente (clearCa-7) Nierenkarzinomzelllinie gegenüber Zytostatika- oder TRAIL-vermittelter Apoptose erkennen.

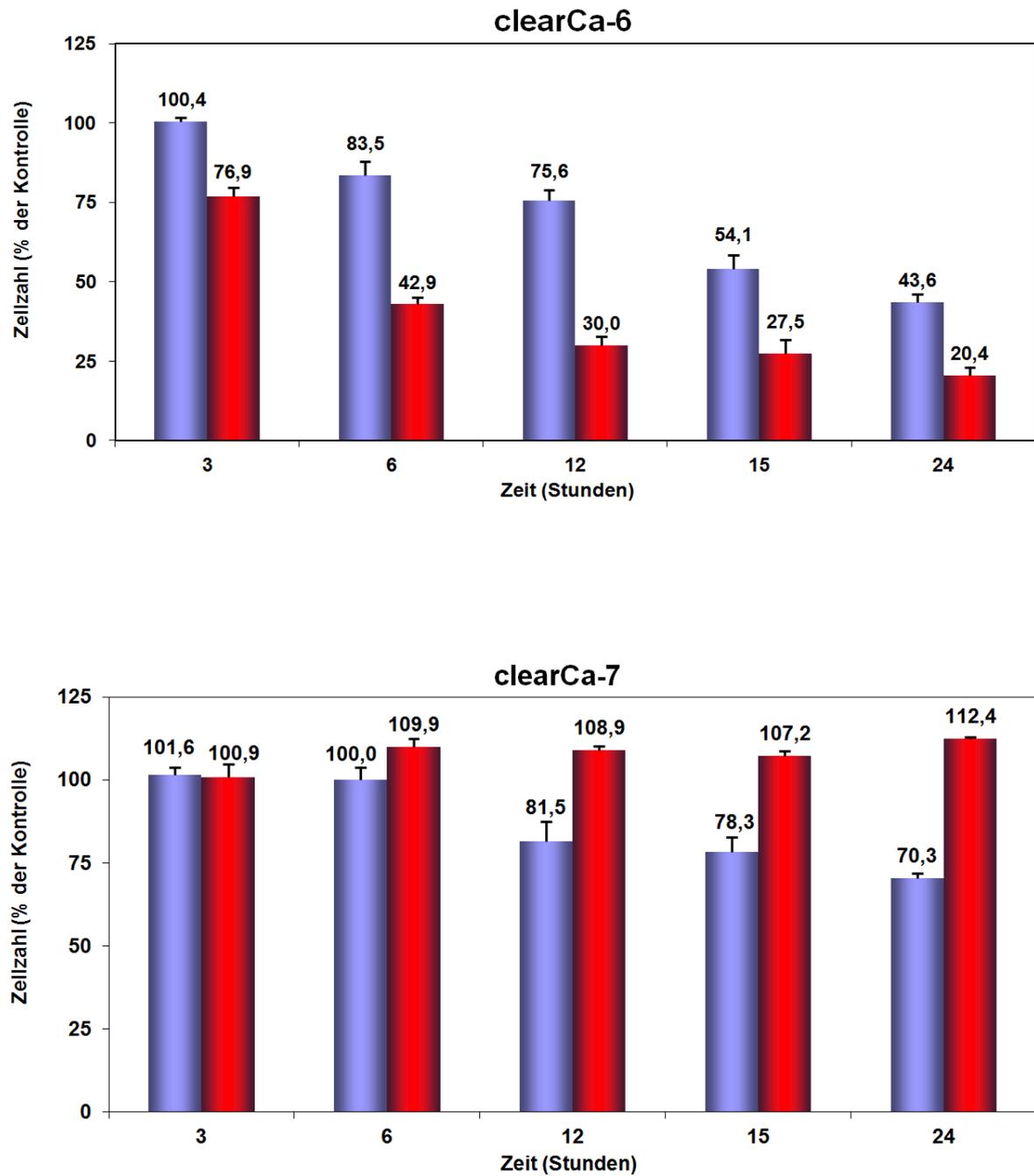


Abb. 4.1: Effekte der Topotecan- oder TRAIL-induzierten Apoptose auf die Zellzahl in Nierenkarzinomzelllinien. Signifikante ($p < 0,05$) Reduktion der Zellzahl nach Exposition mit Topotecan (100 ng/ml) (blaue Säulen) oder rhs-TRAIL (100 ng/ml) (rote Säulen) in clearCa-6. Geringe Abnahme der Zellzahl nach Exposition mit Topotecan bzw. keine Reduktion der Zellzahl nach Exposition mit rhs-TRAIL in clearCa-7. Angegeben sind jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

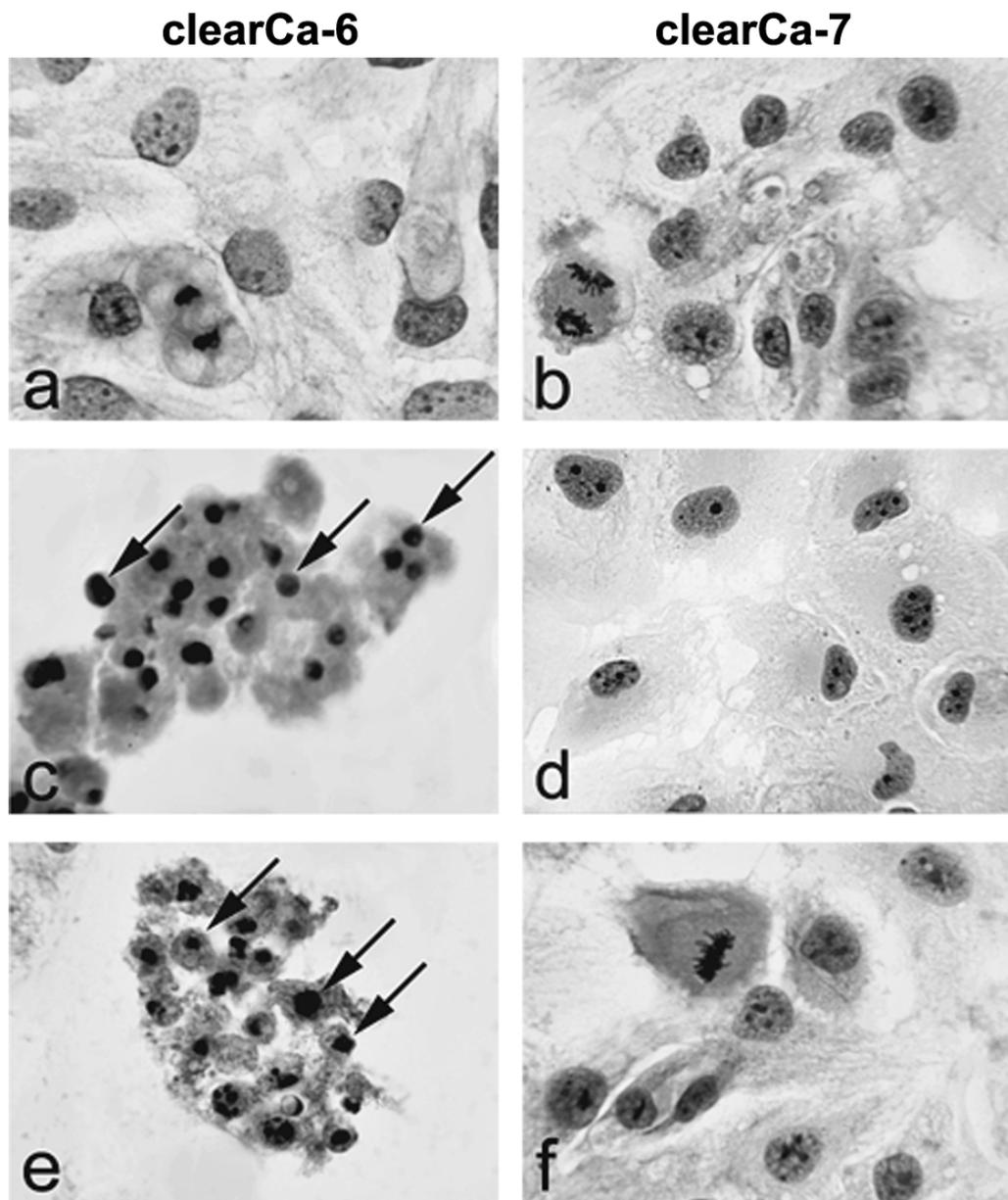


Abb. 4.2: Morphologische Nachweis Topotecan- oder TRAIL-induzierter Apoptose in Nierenkarzinomzelllinien. Unbehandelte Kontrolle der Zelllinie clearCa-6 (a) und der Zelllinie clearca-7 (b). Massive Zunahme der Apoptose-Figuren in clearCa-6 nach Exposition mit Topotecan (100 ng/ml) (c, Pfeile) oder rhs-TRAIL (100 ng/ml) (e, Pfeile). Keine Apoptose-Figuren in clearCa-7 nach Exposition mit Topotecan (d) oder rhs-TRAIL (f). (Pfeile markieren eine Apoptose-Figur)

4.1.2 Unterschiede im Status der Genexpression in Apoptose-sensitiven und -resistenten Nierenkarzinomzelllinien

Um die Gene zu identifizieren, die möglicherweise für die beobachteten Unterschiede in der Apoptosesensitivität verantwortlich sein könnten, wurden cDNA-Microarray Analysen durchgeführt.

Hierzu wurden die Apoptose-sensitive Zelllinie clearCa-6 und die Apoptose-resistente Zelllinie clearCa-7 mit Topotecan (100 ng/ml) oder rhs-TRAIL (100 ng/ml) exponiert und die differentiell exprimierten Gene nach 24 Stunden bzw. 12 Stunden analysiert. Der Grenzpunkt für die Abnahme und die Zunahme der Genexpression war 0,5- bis 1,5- fache Änderung der Genexpression (vgl. Tab. 4.1). Die 1,6- bis 3-fache Zunahme der Genexpression zeigte eine geringe, 3,6- bis 6-fache Zunahme eine mittelstarke und mehr als 6-fache Zunahme eine starke Induktion der Genexpression an. Die Membran des Microarrays enthielt spezifische cDNA-Oligonukleotide für insgesamt 205 Gene, die funktionell an der Induktion und Regulation der Apoptose beteiligt sein können.

Die cDNA-Expression Analysen zeigten eine gesteigerte Expression von 129 Genen (62,8%) nach Exposition mit Topotecan in der Apoptose-sensitiven Zelllinie clearCa-6 (14; 6,8% stark, 37; 18,0% mittelstark und 78; 38,0% gering). 66 Gene (32,3%) zeigten eine unveränderte Expression und 10 (4,9%) eine verminderte Expression. Nach Exposition mit TRAIL war eine Zunahme der Expression von 87 Genen (42,5%) in clearCa-6 nachweisbar (11; 5,4% stark, 22; 10,8% mittelstark und 54; 26,3% gering), während 80 Gene (39,0%) transkriptionell unverändert blieben und 38 Gene (18,5%) eine verminderte Expression aufwiesen. Im Gegensatz dazu induzierte Topotecan in der resistenten Zelllinie clearCa-7 einen Expressionsanstieg von lediglich 22 Genen (10,8%) (3 Gene; 1,5% stark, 1 Gen; 0,5% mittelstark und 18 Gene; 8,8% gering). Dabei blieben 158 Gene (77,1%) transkriptionell unverändert und 25 Gene (12,1%) zeigten eine Abnahme der Expression. Ebenso wurden nur 40 Gene (19,6%) nach Exposition mit TRAIL transkriptionell hochreguliert (2; 0,95% stark, 4; 1,95% mittelstark und 34; 16,7% gering). 141 Gene (68,7%) zeigten keine Änderung im Expressionsstatus und 24 Gene (11,7%) wiesen eine Abnahme der Expression auf.

Mit Hilfe des verwendeten cDNA-Microarrays wurde insbesondere die Expressionsänderung von 60 Genen analysiert und gemäß ihrer jeweiligen Funktion in die Klassen eingeordnet. Die untersuchten Gene kodieren dabei beispielsweise für folgende Proteine: die funktionell an der Regulation der klassischen Caspase-vermittelten Signalwege der Apoptose beteiligt sein können; die Transkriptionsfaktoren p53, E2F1 und die assoziierten Faktoren DP und RB sowie die für die Transaktivierung von E2F1 notwendigen diversen Kinasen; eine Vielzahl von unmittelbar pro-apoptotisch wirkenden Faktoren, die transkriptionell von p53 und/oder E2F1 induzierbar sind; der anti-apoptotische Transkriptionsfaktor NF- κ B und die NF- κ B-induzierbaren weiteren anti-apoptotischen Faktoren (um einen Vergleich zur Expression der pro-apoptotischen Gene zu ziehen); einzelne Stressproteine sowie weitere pro- und anti-apoptotisch wirksame Faktoren.

Tabelle 4.1 fasst die Ergebnisse für die cDNA-Expression der analysierten Gene zusammen.

Genbank-Acc.-Nr.	Gene	NB	clearCa-6		clearCa-7	
			Topotecan	TRAIL	Topotecan	TRAIL
Wichtige Transkriptionsfaktoren						
M96577	<i>E2F1</i>	A	6	6	1	1
L23959	<i>DP1</i>		0,5	1	0,5	0,4
U18422	<i>DP2</i>		2	1	1	1
M14694	<i>P53</i>		2	1	1	1
M15400	<i>RB1</i>		2	1	0,5	1
X74594	<i>RB2</i>		8	0	0,2	1
p53-regulierbare Gene						
M60974	<i>GADD45</i>	A	59	40	20	3
U09579	<i>P21</i>	A	12	0	1	1
AF010310	<i>PIG6</i>		2	2	1	2
Z70519	<i>CD95</i>		2	10	1	2
AF016268	<i>DR5</i>		1	1	1	1
L22474	<i>BAX</i>		2	3	3	1
Z12020	<i>MDM2</i>		3	1	1	1
AF013263	<i>APAF-1</i>	B	++	++	-	-
E2F1-regulierbare Gene						
U56390	<i>CASP-9</i>	A	6	4	1	0,4
M81933	<i>CDC25A</i>	A	24	8	1	1
M73812	<i>Cyclin E1</i>		28	0	0,4	2
Y11416	<i>P73</i>		2	1	1	1
U13737	<i>CASP3</i>		2	2	1	1
U37448	<i>CASP7</i>		3	0	2	1
U60520	<i>CASP8</i>		2	2	1	0,2
M15796	<i>PCNA</i>		0,2	1	2	1
Y10256	<i>NIK</i>	A	2	7	1	1
U58334	<i>PIN1</i>		1	1	0,5	1
p53- und/oder E2F1-regulierbare Gene						
U17075	<i>ARF</i>		2	1	1	0,2
U66879	<i>BAD</i>		1	1	1	1
U23765	<i>BAK1</i>		3	3	1	1
Die an der RB-Phosphorylierung beteiligten Gene						
M68520	<i>CDK2</i>		5	3	1	2
M14505	<i>CDK4</i>		1	2	1	1
X59798	<i>Cyclin D1</i>		1	1	1	1
M90813	<i>Cyclin D2</i>		4	3	1	1
M92287	<i>Cyclin D3</i>		3	2	1	1
X66365	<i>CDK6</i>		1	1	0,5	0,2
U22398	<i>p57</i>		5	0	1	2
L27211	<i>p16</i>		3	2	1	1
U40343	<i>p19</i>		2	1	1	1
Relative Änderung und zugehörige Farbcode der cDNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle						
Abnahme		keine Änderung	Z u n		a h m e	
< 0,5 fache		0,5 – 1,5	1,6 – 3 (gering)		3,1 – 6 (mittelstark)	
					> 6 (stark)	

Tab. 4.1: Ergebnis der cDNA-Microarray Analyse für die gewählten Gene nach Exposition mit Topotecan (100 ng/ml) und rhs-TRAIL (100 ng/ml) in der Apoptose-sensitiven Zelllinie clearCa-6 und der Apoptose-resistenten Zelllinie clearCa-7. Gene wurden in verschiedenen funktionellen Gruppen angeordnet. Stark differentielle Expression zahlreicher Gene in clearCa-6 und gering differentielle Expression der Gene in clearCa-7 im Vergleich zur Kontrolle; grün: Abnahme der Expression (< 0,5-fache Expression), grau: unveränderte Expression (0,5- bis 1,5-fache Expression), gelb: geringe Zunahme der Expression (1,6- bis 3-fache Expression), orange: mittelstarke Zunahme der Expression (3,1- bis 6-fache Expression), rot: starke Zunahme der Expression (> 6-fache Expression); (A) Das Ergebnis wurde im Northern Blot (NB) überprüft und bestätigt; (B) Die verwendete Arraymembran enthielt keine cDNA für das entsprechende Gen: Das Ergebnis zeigt die densitometrische Bewertung des im Northern Blot untersuchten Expressionsstatus der entsprechenden mRNA (+: mittelstarke Zunahme der mRNA-Expression, -: unveränderte mRNA-Expression).

Fortsetzung der Tabelle 4.1 auf Seite 58

Fortsetzung der Tabelle 4.1

Genbank-Acc.-Nr.	Gene	NB	ClearCa-6		clearCa-7		
			Topotecan	TRAIL	Topotecan	TRAIL	
M58603	<i>NFKB</i>		7	4	0,5	1	
NF-κB-regulierbare Gene							
U29680	<i>BCL2A1</i>	A	6	10	0,5	1	
AF010127	<i>c-FLIP</i>		2	1	1	0,4	
U45878	<i>IAP1</i>		2	4	1	1	
U45880	<i>XIAP</i>		1	1	3	3	
AP1-regulierbare Gene							
U08137	<i>CD95L</i>		1	1	1	1	
X59798	<i>Cyclin D1</i>		1	1	1	1	
IAP- und -relevante Gene							
U45879	<i>IAP2</i>		4	1	1	1	
U75285	<i>survivin</i>		3	2	1	1	
AF262240	<i>DIABLO</i>	B	-	-	-	-	
BCL-2- und -relevante Gene							
U15174	<i>BNIP3</i>		12	7	0,5	1	
M14745	<i>BCL2</i>		5	1	1	1	
U59747	<i>BCL-W</i>		3	2	2	5	
S83171	<i>BAG1</i>		2	2	0,5	1	
Zellmembran-Rezeptoren							
U90875	<i>DR4</i>		1	1	0,3	1	
M33294	<i>TNFR1</i>		1	3	1	0,3	
M32315	<i>TNFR2</i>		1	2	0,5	2	
Caspasen							
U13699	<i>CASP1</i>		1	1	1	1	
U13021	<i>CASP2</i>		1	2	1	1	
U60519	<i>CASP10</i>		3	2	0,4	1	
U20536	<i>CASP6</i>		2	2	1	2	
U28014	<i>CASP4</i>		1	1	1	0,3	
Antioxidantien (Ceramid-Antagonisten)							
Y00483	<i>GPX1</i>		1	70	0,4	2	
Kinasen JNK							
L26318	<i>JNK1</i>		5	0	1	1	
L31951	<i>JNK2</i>		5	6	1	3	
Relative Änderung und zugehörige Farbcode der cDNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle							
Abnahme		keine Änderung		Zunahme		Abnahme	
< 0,5 fache		0,5 – 1,5		1,6 – 3 (gering)		3,1 – 6 (mittelstark)	
						> 6 (stark)	

Die Ergebnisse des verwendeten Microarrays wurden exemplarisch für einzelne Transkripte mittels der Northern Blot Methode überprüft (Abb. 4.3). Dabei sind die Produkte der entsprechenden Gene sind der Zellzyklus- oder Apoptose-induzierende Transkriptionsfaktor *E2F1*, die E2F1-induzierbare *Caspase-9* und *CDC25A* (Thyrosinphosphatase), die p53-induzierbare *GADD45* (Stressprotein) und *p21^{CIP/WAF1}* (CDK2-Inhibitor) sowie die NF-κB-induzierende Kinase *NIK* und das NF-κB-regulierbare anti-apoptotische Bcl-2-Mitglied *Bcl-2A1*. 26 von 28 Änderungen (~93%) in der im cDNA-Microarray detektierten Genexpression konnten bestätigt werden. Dabei zeigte sich eine leichte Zunahme in der mRNA-Expression von p21 nach Exposition mit Topotecan oder rhs-TRAIL in der Apoptose-resistenten Zelllinie clearCa-7, während sich im cDNA-Microarray keine nennenswerte Änderung fand (Abb. 4.3, Tab. 4.1).

Da eine entsprechende cDNA-Sonde auf dem verwendeten Microarray nicht vorhanden war, wurden darüber hinaus weitere Northern Blot Untersuchungen durchgeführt, um die Wirkung von Topotecan oder rhs-TRAIL auf die mRNA-Expression von APAF-1 und Smac/DIABLO zu analysieren. APAF-1 und Smac/DIABLO sind zwei pro-apoptotische Faktoren, die vor allem für die Aktivierung des intrinsischen Signalweges der Apoptose von funktioneller Bedeutung sind (Li et al., 1997; VERHAGEN et al., 2000). Die durchgeführten Northern Blot Untersuchungen ergaben einen deutlichen Anstieg der APAF-1 mRNA-Expression nach Exposition mit Topotecan oder rhs-TRAIL in der Apoptose-sensitiven Zelllinie clearCa-6, während diese in der Apoptose-resistenten Zelllinie clearCa-7 unverändert blieb (Tab. 4.1, Abb. 4.3). Darüber hinaus war eine unveränderte Expression der Smac/DIABLO mRNA in den beiden Zelllinien nachweisbar (Tab. 4.1, Abb. 4.3).

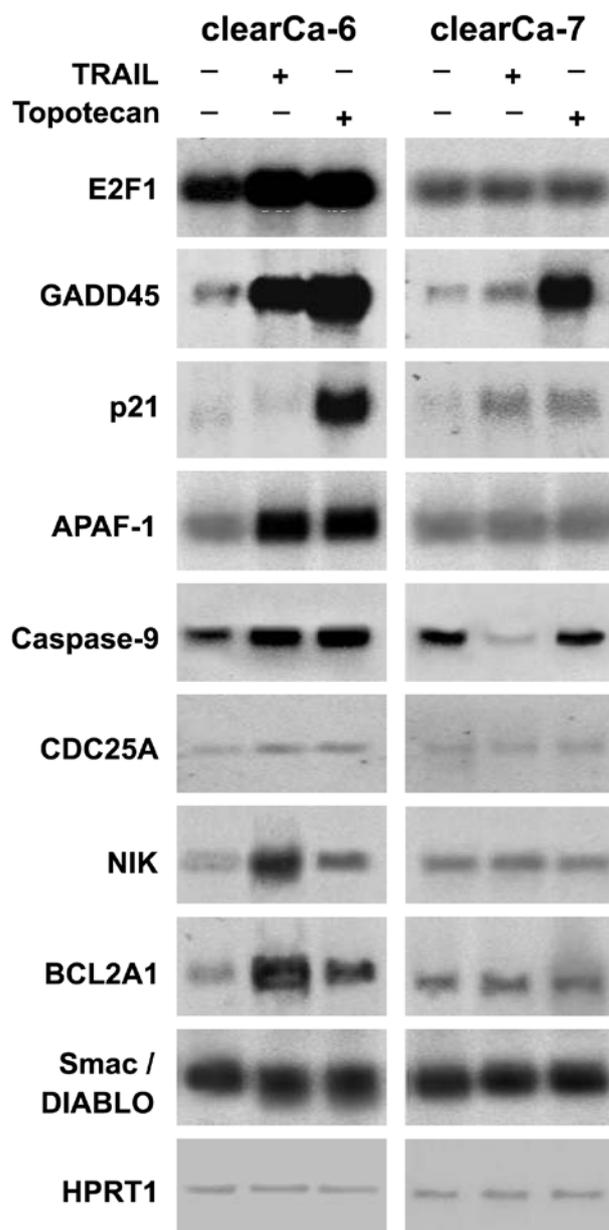


Abb. 4.3: Northern Blot Analysen zur Überprüfung der durch rhs-TRAIL (100 ng/ml) oder Topotecan (100 ng/ml) induzierten differentiellen Genexpression in der sensitiven Zelllinie clearCa-6 und der resistenten Zelllinie clearCa-7. Ergebnisse des cDNA-Microarrays wurden exemplarisch für die Transkripte *E2F1*, *GADD45*, *p21*, *Caspase-9*, *CDC25A*, *NIK*, *Bcl-2A1* bestätigt. Zusätzlich wurde die mRNA-Expression von *APAF-1* und *Smac/DIABLO* untersucht. Nach Exposition mit rhs-TRAIL oder Topotecan nahm die Expression der *APAF-1* mRNA in clearCa-6 deutlich zu, während sie in clearCa-7 unverändert blieb. Die Expression der *Smac/DIABLO* mRNA hingegen zeigte keine Änderung nach Exposition mit rhs-TRAIL oder Topotecan in clearCa-6 und -7. Die unveränderte mRNA-Expression des Haushaltsgens Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase (*HPRT1*) vor und nach Behandlung mit rhs-TRAIL oder Topotecan bestätigt die Gleichheit der für die Untersuchung eingesetzten RNA-Menge.

4.1.2.1 Differentielle Genexpression in der Topotecan-sensitiven Zelllinie clearCa-6

Die Exposition mit Topotecan resultierte in einem außergewöhnlich komplexen Profil der differentiell exprimierten Gene in der Apoptose-sensitiven Nierenkarzinomzelllinie clearCa-6 (Tab. 4.1, Abb. 4.3; Abb. 4.4a, b).

Nach heutiger Vorstellung führen geno-toxische Zytostatika (wie z.B. Topotecan) zu einer Aktivierung von diversen Transkriptionsfaktoren wie p53 und E2F1 (LIN et al., 2001; NORBURY & ZHIVOTOVSKY, 2004; POLAGER & GINSBERG, 2008, 2009). Die vorliegende Untersuchung ergab eine unterschiedliche Zunahme der mRNA-Expression von *P53* und *E2F1* (Abb. 4.4a).

Darüber hinaus zeigten ebenfalls diverse p53-Zielgene eine Zunahme der mRNA-Expression. Dabei zeigte sich eine verstärkte Zunahme der Expression von charakteristischen p53-Zielgenen wie *GADD45* und *P21* (HOLLANDER et al., 1993; Johnson et al., 1994) (Abb. 4.4a, b). Die mRNA des pro-apoptotischen Faktors *APAF-1*, das bei DNA-Schäden transkriptionell primär von p53 induzierbar ist (PEDICONI et al., 2003), wurde ebenfalls stark exprimiert. Ferner war ein unterschiedlicher Anstieg der mRNA-Expression von *PIG6* (bekannt auch als p53-induziertes Protein p53ip), *CD95*, *MDM2* und *BAX* (BARAK et al., 1993; WU et al., 1997) nachweisbar, während die Expression der DR5-mRNA unverändert blieb.

Die vorliegende Untersuchung zeigte wie bei *E2F1* ebenfalls eine verstärkte Zunahme der mRNA-Expression von *RB1* (*pRb1*, genannt auch *p110^{RB}*) und *RB2* (*pRb2*, genannt auch *p130^{RB}*), deren Genprodukte über die Inaktivierung der Transkriptionsfaktoren E2F und DP den Eintritt in die S-Phase hemmen (HELIN et al., 1993; YAMASAKI, 2003) (Abb. 4.3, Abb. 4.4a). Des Weiteren war eine vermehrte mRNA-Expression der Cyclin-abhängigen Kinase *CDK2* sowie der Cycline *Cyclin D2* und *-D3* nachweisbar, während *CDK4*, *CDK6* und Cyclin D1 keine veränderte mRNA-Expression aufwiesen. Ferner war ein unterschiedlicher Expressionsanstieg der mRNA von CDK-Inhibitoren *p57^{KIP2}*, *p16^{INK4}* und *p19^{INK4D}* nachweisbar (Tab. 4.1, Abb. 4.4a). Die vorliegende Untersuchung zeigte weiterhin eine unveränderte Expression der DP1-mRNA nach Topotecan-Exposition in clearCa-6, während die Expression der DP2-mRNA leicht zunahm (Tab. 4.1).

Darüber hinaus war eine differentielle Expression einzelner E2F1-Zielgene nachweisbar (Tab. 4.1, Abb. 4.4a). Dabei zeigte sich eine verstärkte Expressionszunahme der *CDC25A*-, *Cyclin E*- und *Caspase-9*-mRNA. Auch *p73*, welches bei DNA-Schädigung primär von E2F1 induzierbar ist (PEDICONI et al., 2003), sowie *Caspase-3*, *-7* und *-8* zeigten eine Zunahme der mRNA-Expression. Ferner zeigte sich ein leicht erhöhter Expressionsanstieg der mRNA von *NIK*, der NF-κB-induzierenden Kinase, welche funktionell an der TRAF-2-vermittelten Aktivierung des anti-apoptotischen Transkriptionsfaktors NFκB beteiligt ist (STANELLE et al., 2002).

Neben diesen Genen, die transkriptionell ausschließlich von p53 oder E2F1 induzierbar sind, kann die Expression einer Vielzahl von Genen sowohl von p53 als auch von E2F1 induziert werden (Abb. 4.4a). Die vorliegende Untersuchung zeigte eine leichte Zunahme der mRNA-Expression des pro-apoptotischen Faktors *BAK1* sowie eine unveränderte mRNA-Expression von *BAD*, eines weiteren pro-apoptotischen Faktors. *p14^{ARF}* ist eine Kinase, die bei DNA-Schäden über eine Aktivierung die aktivierende Stabilisierung von p53 und E2F1 fördert. E2F1 induziert die Transkription der *p14^{ARF}*, während p53 diese inhibiert (ZINDY et al., 1998).

Die vorliegende Untersuchung ergab eine leicht erhöhte Expression der $p14^{ARF}$ -mRNA. Darüber hinaus wurden auch weitere, transkriptionell von p53- und E2F1-induzierbare pro-apoptische Gene differentiell exprimiert. Zu verzeichnen war dabei eine unterschiedlich erhöhte Zunahme der mRNA-Expression von *Caspase-6*- und *-10* sowie von *BNIP3*, welches ein pro-apoptisches Mitglied der BCL-2-Familie ist (Tab. 4.1).

Dagegen war keine transkriptionelle Expressionssteigerung der Zellmembran-Rezeptoren TNF-R1, TNF-R2 und DR4 nachweisbar (Tab. 4.1).

Nach Exposition mit Topotecan zeigte die vorliegende Untersuchung ebenfalls eine Zunahme der mRNA-Expression von Stresskinasen *JNK1* und *JNK2* (Tab. 4.1), die unter anderem auch an der Regulation der Apoptose beteiligt sein können (DERIJARD et al., 1994; DAVIS, 2000).

Hervorzuheben ist weiterhin, dass auch einzelne anti-apoptische Gene nach Behandlung mit Topotecan in clearCa-6 differentiell exprimiert wurden (Tab. 4.1, Abb. 4.4a). Zu verzeichnen war dabei eine vermehrte Zunahme der mRNA-Expression von *NF-κB*. Darüber hinaus wurden diverse anti-apoptische Gene für die Mitglieder der Bcl-2- und IAP-Familie, welche direkt von NF-κB induzierbar sind, exprimiert (Abb. 4.4a). Dabei zeigten beispielsweise *Bcl-2A1* (ein anti-apoptisches Mitglied der Bcl-2-Familie) sowie *IAP1* und *c-FLIP* (zwei anti-apoptische Mitglieder der IAP-Familie) einen unterschiedlich erhöhten Anstieg der mRNA-Expression. Des Weiteren wurden anti-apoptische Gene wie *BCL2*, *BCL-W* und *BAG1* sowie *IAP2* und *survivin*, welche indirekt von NF-κB induzierbar sind, gering bis mittelstark exprimiert. Dagegen war eine unveränderte mRNA-Expression von XIAP (ein transkriptionell direktes NF-κB-Zielgen) und Smac/DIABLO (ein pro-apoptischer Faktor als natürlicher XIAP-Inhibitor) nachweisbar. Ferner war nachweisbar, dass die mRNA-Expression der Glutathionperoxidase GPX1 (ein Entgiftungsenzym von ROS; Reactive Oxygen Species) unverändert blieb.

4.1.2.2 Differentielle Genexpression in der TRAIL-sensitiven Zelllinie clearCa-6

Als nächstes wurde die TRAIL-induzierte differentielle Genexpression analysiert und die durch das rekombinante TRAIL und das geno-toxische Zytostatikum Topotecan induzierten Profile wurden verglichen. Interessanterweise zeigte diese Analyse ein ähnliches, jedoch nicht identisches Muster der Genexpressionsprofile zwischen Topotecan und TRAIL (Tab. 4.1, Abb. 4.3, Abb. 4.4a, b).

Die TRAIL-Behandlung führte in clearCa-6 zu einer differentiellen Expression einer Vielzahl von p53-Zielgenen, während keine unveränderte mRNA-Expression von p53 zu verzeichnen war (Abb. 4.4b). Dabei zeigte die mRNA-Expression von *GADD45*, *APAF-1*, *CD95*, *BAX* und *PIG6* eine unterschiedlich verstärkte Zunahme. Dagegen war eine unveränderte mRNA-Expression von DR5 und MDM2 nachweisbar. Der CDK-Inhibitor *p21*, dessen Gen eines der Haupt-Zielgene des Transkriptionsfaktors p53 ist, zeigte eine verminderte mRNA-Expression.

Ähnlich wie bei Topotecan, führte die Exposition mit TRAIL ebenfalls zu einer verstärkten mRNA-Expression von *E2F1* in clearCa-6. Dagegen war ein unterschiedliches Expressionsprofil der RB-Gene nachweisbar. Dabei zeigte sich eine verminderte mRNA-Expression von *RB2*, während der Expressionsstatus der *RB1*-mRNA unverändert blieb (Tab. 4.1).

Darüber hinaus zeigten die Cyclin-abhängigen Kinasen und deren Inhibitoren sowie die D-Typ-Cycline ebenfalls ein komplexes Profil der Genexpression nach TRAIL-Behandlung. Mit Ausnahme einer leicht erhöhten Expressionszunahme der *CDK4*-mRNA, einer verminderten Expression der *p57*-mRNA und einer unveränderten Expression der *p19*-mRNA waren dabei im mRNA-Expressionsstatus dieser Zellzyklusregulatoren keine weitere große Unterschiede nachweisbar (vgl. Tab. 4.1). Zu verzeichnen war ferner eine unveränderte Expression der DP1- und DP2-mRNA.

Einige E2F1-Zielgene hingegen wurden nach Exposition mit TRAIL exprimiert und der Status ihrer Expression war im Vergleich zu Topotecan äußerst ähnlich (Abb. 4.4b). Dabei wurde die mRNA-Expression von *CDC25A*, *Caspase-8*, *-9* und *Caspase-3* ebenfalls gering bis stark induziert und eine differentielle Expression der mRNA von PCNA und *p73* nicht zu verzeichnen, während sich im Expressionsniveau der *Cyclin E*-, *Caspase-7*- und *p73*-mRNA eine Zunahme zeigte. Ferner wurde die Genexpression für *NIK*, die $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -induzierenden Kinase, vermehrt induziert.

Der Transkriptionsfaktor p53 und/oder E2F1 kann die Expression von diversen Genen induzieren (Tab. 4.1, Abb. 4.4b). Das Expressionsniveau der *BAD*-mRNA veränderte sich nach Exposition mit TRAIL nicht und die mRNA-Expression von *BAK1* wurde - ähnlich wie bei Topotecan - ebenfalls schwach induziert. Ferner zeigte sich eine leichte Zunahme im mRNA-Expressionsniveau von *Caspase-10*, während die Expression der $p14^{\text{ARF}}$ - und *Caspase-6*-mRNA unverändert blieb.

Im Gegensatz zu Topotecan wurden die mRNA-Expression von *TNF-R1* und *TNF-R2* nach Gabe von TRAIL schwach induziert, während die *DR4*-Expression unverändert blieb.

Neben diesen pro-apoptotischen Genen wurden weiterhin zahlreiche anti-apoptotische Gene nach Exposition mit TRAIL transkriptionell induziert, wobei die erzielten Ergebnisse im Vergleich zu Topotecan ähnlich waren. Dabei wurde die Transkription von *NF-}\kappa\text{B}* mittelstark induziert. Weiterhin wurden die $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -regulierten Mitglieder der Bcl-2- und IAP-Familie (*Bcl-2A1* und *IAP1*) mittelstark bis stark induziert (Tab. 4.1, Abb. 4.4b). Dagegen blieb die mRNA-Expression von XIAP sowie von c-FLIP unverändert. Eine differentielle Genexpression zeigten darüber hinaus auch die anderen anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2- und IAP-Familie, welche primär keine Zielgene von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ sind (Tab. 4.1). Dabei wurden die Transkripte von *Bag-1* und *Bcl-w* (Mitglieder der Bcl-2-Familie) sowie von *Survivin* (ein Mitglied der IAP-Familie) nach TRAIL-Behandlung - ähnlich wie bei Topotecan - leicht induziert, während der transkriptionelle Expressionsstatus von Bcl-2, IAP2, XIAP und dessen Inhibitor Smac/DIABLO keine Änderung aufwies. Interessanterweise führte die TRAIL-Behandlung zu einer verstärkten Zunahme der mRNA-Expression der anti-apoptotischen Glutathionperoxidase *GPX1* in clearCa-6.

4.1.2.3 Differentielle Genexpression in der Topotecan-resistenten Zelllinie clearCa-7

Während die Exposition der Topotecan-sensitiven Zelllinie clearCa-6 in einem außerordentlich komplex differentiellem Expressionsprofil von vielfachen Genen resultierte, wurden lediglich eine geringe Anzahl von Genen in der resistenten Zelllinie clearCa-7 unterschiedlich exprimiert.

Wie in Tabelle 4.1 und Abbildung 4.4c dargestellt, blieb dabei die p53-mRNA-Expression ebenfalls unverändert, während die p53-induzierbare *GADD45*-mRNA stark exprimiert wurde. Darüber hinaus war nur eine leicht erhöhte mRNA-Expression von *BAX* zu verzeichnen, während die weiteren p53-Zielgene keine differentielle Expression zeigten (vgl. Tab. 4.1).

In ähnlicher Weise wurde auch die Expression der E2F1-mRNA sowie der DP1- und DP2-mRNA nicht induziert. Die *RB2*-mRNA zeigte jedoch eine verminderte Expression, während die Expression der *RB1*-mRNA unverändert blieb. Cycline, CDKs und CDK-Inhibitoren zeigten ebenfalls eine unveränderte mRNA-Expression.

Konsequenterweise war keine transkriptionelle Induktion der meisten E2F1-Zielgene nachweisbar (vgl. Tab. 4.1, Abb. 4.5c). Eine Zunahme zeigte jedoch lediglich die mRNA-Expression von *Caspase-7* und *PCNA*, während sich im mRNA-Expressionsstatus der *Caspase-8* eine Abnahme fand. Mit Ausnahme des *Caspase-10*-Transkripts, das eine verminderte Expression aufwies, war keine differentielle Expression der meisten anderen Caspasen sowie der NF-κB-induzierender Kinase NIK nachweisbar.

Die Expression von p53 und/oder E2F1 induzierbaren Genen blieb ebenfalls unverändert.

Interessanterweise wurden im Vergleich zu der sensitiven Zelllinie clearCa-6 einige Unterschiede in der Expression von einzelnen pro-apoptischen Genen beobachtet. Dabei war eine verminderte Expression des *DR4*-Transkripts nachweisbar, während die Transkripte von TNF-R1 und TNF-R2 keine differentielle Expression zeigten.

Bezüglich der anti-apoptischen Gene zeigte sich ebenfalls ein ähnliches Profil im Vergleich zu der sensitiven Zelllinie (vgl. Abb. 4.5c). Während lediglich das anti-apoptische Gen *XIAP* eine geringe Zunahme in der mRNA-Expression zeigte, war dabei keine Änderung im Expressionsstatus der NF-κB-mRNA und der meisten transkriptionell von NF-κB-induzierbaren Gene nachweisbar. Innerhalb der Bcl-2-Genfamilie wurde lediglich *Bcl-w* verstärkt exprimiert, während andere Mitglieder der Bcl-2- und IAP-Familie (wie z.B. Bcl-2 und Bcl-2A1 bzw. IAPs und Survivin) keine Änderung in der Expression aufwiesen. Im Gegensatz zu TRAIL führte die Exposition mit Topotecan zu einer Abnahme der mRNA-Expression der Glutathionperoxidase *GPX1* in der resistenten Zelllinie clearCa-7.

4.1.2.4 Differentielle Genexpression in der TRAIL-resistenten Zelllinie clearCa-7

Ähnlich wie bei Topotecan, wurden nur eine kleine Anzahl von Genen in der resistenten Zelllinie clearCa-7 nach Exposition mit rekombinantem TRAIL-Liganden differentiel exprimiert.

Dabei war eine Expressionsänderung des p53-mRNA-Transkripts nicht nachweisbar, während das p53-induzierbare Gen *GADD45* einen schwachen Expressionsanstieg aufwies. *PIG6* und *CD95* wurden nach TRAIL-Exposition ebenfalls leicht erhöht exprimiert, während die anderen p53-Zielgene transkriptionell unverändert blieben (Tab. 4.1, und Abb. 4.5d).

Konsequenterweise fand sich keine differentielle Genexpression für E2F1, RB1, RB2 und DP2, während das *DP1*-Transkript eine verminderte Expression aufwies.

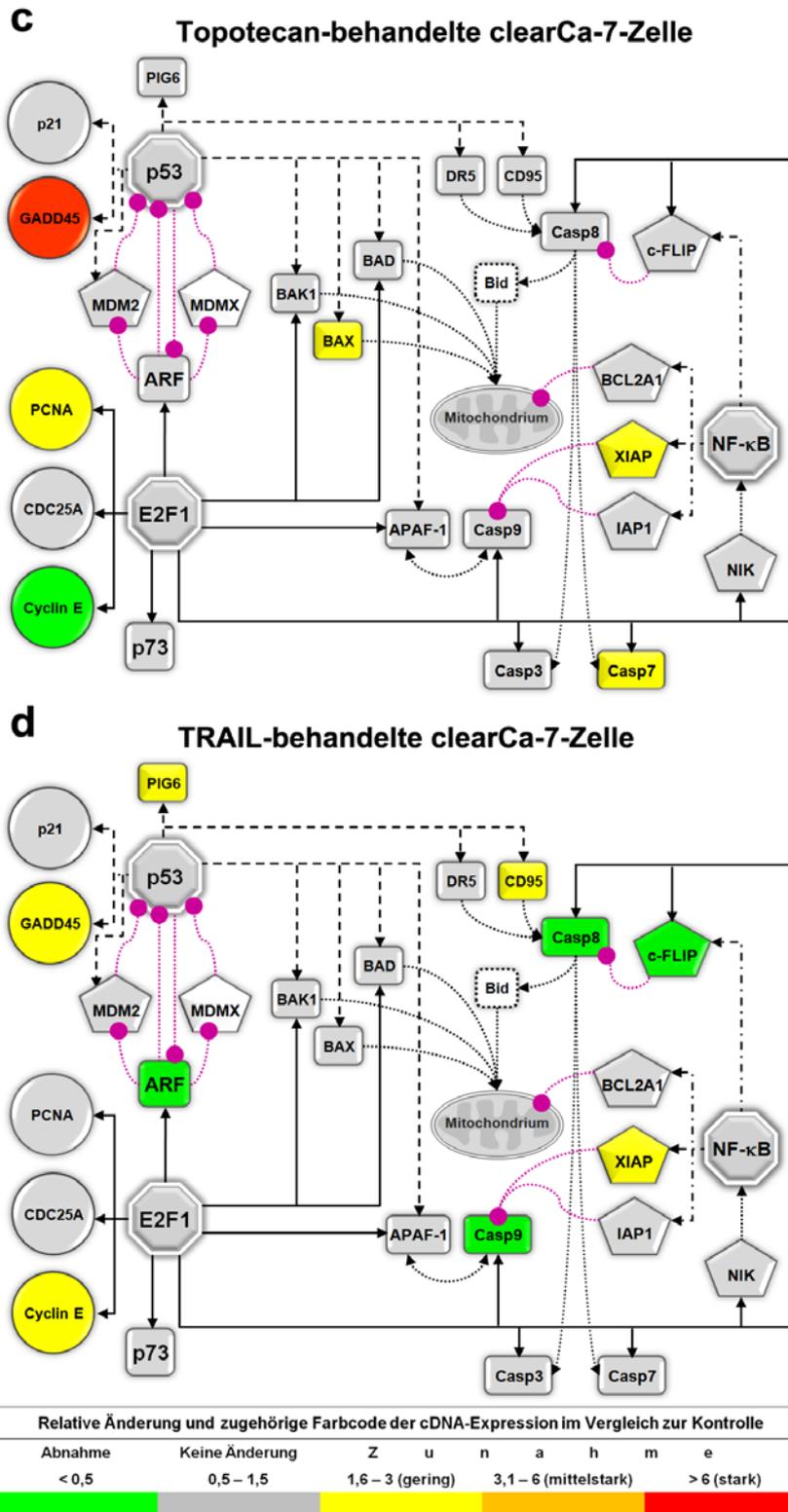


Abb. 4.5: Schematische Übersichtsdarstellung der in Topotecan- oder TRAIL-vermittelter Apoptose (c bzw. d) differentiell exprimierten Gene in der resistenten Nierenkarzinomzelllinie clearCa-7. Achtecke: die wichtigen Transkriptionsfaktoren p53, E2F1 und NF-κB; Kreise: die an der Zellzyklus-Regulation beteiligten Gene; Rechtecke: die proapoptischen Gene; Fünfecke: die anti-apoptischen Gene; schwarze Linien/Striche/Strichpunkte mit spitzen Pfeilen: die transkriptionelle Induktion; violette, gepunktete Linien mit runden Pfeilen: die transkriptionelle Repression; gebogene, runde und gepunktete Linien: funktionelle Interaktionen von Proteinprodukten der transkriptionell untersuchten Gene. Farben, die den Genexpressionsstatus kennzeichnen, entsprechen der Tabelle 4.1 auf Seite 57-58.

vgl. Abb. 4.4

Mit Ausnahme einer schwach erhöhten mRNA-Expression von *CDK2* und einer verminderten Expression von *CDK6* war keine nennenswerte Änderung der Genexpression für die untersuchten D-Typ-Cycline, CDKs und CDK-Inhibitoren nachweisbar.

Wie in Abbildung 4.4d dargestellt, wurden darüber hinaus nur die einzelnen E2F1-induzierbaren Gene differentiell exprimiert. Die mRNA-Expression von *Cyclin E* wurde leicht induziert. Darüber hinaus zeigten *Caspase-8*, *-9* und *-4* eine verminderte mRNA-Expression, während die mRNA von *Caspase-6* eine vermehrte Expression aufwies. Allerdings war eine Änderung der Genexpression für die NF-κB-induzierende Kinase NIK nicht nachweisbar.

Mit Ausnahme einer verminderten mRNA-Expression von *p14^{ARF}* wurden die anderen transkriptionell von p53- und E2F1-induzierbaren Gene nach Exposition mit TRAIL in der resistenten Zelllinie nicht differentiell exprimiert (Abb. 4.5d).

Ferner zeigte das *TNF-R1*-Transkript eine verminderte Expression sowie das DR4-Transkript eine unveränderte Expression. TRAIL führte lediglich zu einem Expressionsanstieg des *TNF-R2*-Transkripts in der resistenten Zelllinie clearCa-7, wie es auch in der sensitiven Zelllinie clearCa-6 nachweisbar war.

Von besonderer Bedeutung ist dabei, dass auch die Expression der anti-apoptotischen Gene nur leicht induziert wurden (vgl. Tab. 4.1, Abb. 4.5d). Der anti-apoptotische Transkriptionsfaktor NF-κB selbst zeigte dabei keine differentielle Genexpression. Von den NF-κB-Zielgenen wurde lediglich das anti-apoptotische *XIAP* transkriptionell leicht induziert, während die Transkription von *c-FLIP* verringert war. Die anderen anti-apoptotischen Gene blieben transkriptionell unverändert. Im Vergleich zu Topotecan ist hervorzuheben, dass die Exposition mit TRAIL in der resistenten Zelllinie zu einem äußerst ähnlichen Expressionsmuster von anti-apoptotischen Genen führte. Die mRNA-Expression der anti-apoptotischen Glutathionperoxidase *GPX1* zeigte nach Behandlung mit TRAIL allerdings, im Gegensatz zu Topotecan, eine Zunahme in der resistenten Zelllinie.

4.2 Kombinationswirkung von TRAIL und ionisierender Gamma-Strahlung im humanen Nierenzellkarzinom

4.2.1 TRAIL-vermittelte Apoptose-Induktion in Nierenkarzinomzelllinien

Zur Beurteilung des Ausmaßes der TRAIL-vermittelten Apoptose und der Funktionalität der nachgeschalteten Signalkaskade des TRAIL-Systems wurden acht zufällig ausgewählte Nierenkarzinomzelllinien mit rekombinantem humanem und löslichen (rhs-)TRAIL-Liganden exponiert. Wie in Abbildung 4.6 dargestellt, zeigte sich nach 72-stündiger Exposition mit rhs-TRAIL (10 oder 100 ng/ml) lediglich in drei der 8 Zelllinien (clearCa-6, -14 und -23) ein unterschiedliches Ansprechen mit einer signifikanten Reduktion ($p < 0,01$) der Zellzahl auf minimal $8,5 \pm 1,0$ % der Kontrolle. Die übrigen fünf Zelllinien wiesen entweder keine (clearCa-2, -4 und -7) oder nur eine geringe (clearCa-20, -22) Reduktion der Zellzahl auf. Der Effekt war konzentrationsabhängig, da die Behandlung mit 10 ng/ml rhs-TRAIL lediglich in einer der 8 Zelllinien (clearCa-6) zu einer wachstumshemmenden Wirkung führte.

Darüber hinaus ergaben lichtmikroskopische Analysen der HE-gefärbten Tumorzellen, dass die Reduktion der Zellzahl mit einem deutlichen Anstieg der Apoptosen einherging. So ist in Abbildung 4.7 ein repräsentatives Bild dargestellt (vgl. auch Abb. 4.2a und e), wie es sich in der sensitiven Zelllinie clearCa-6 nach Exposition mit rhs-TRAIL zeigte.

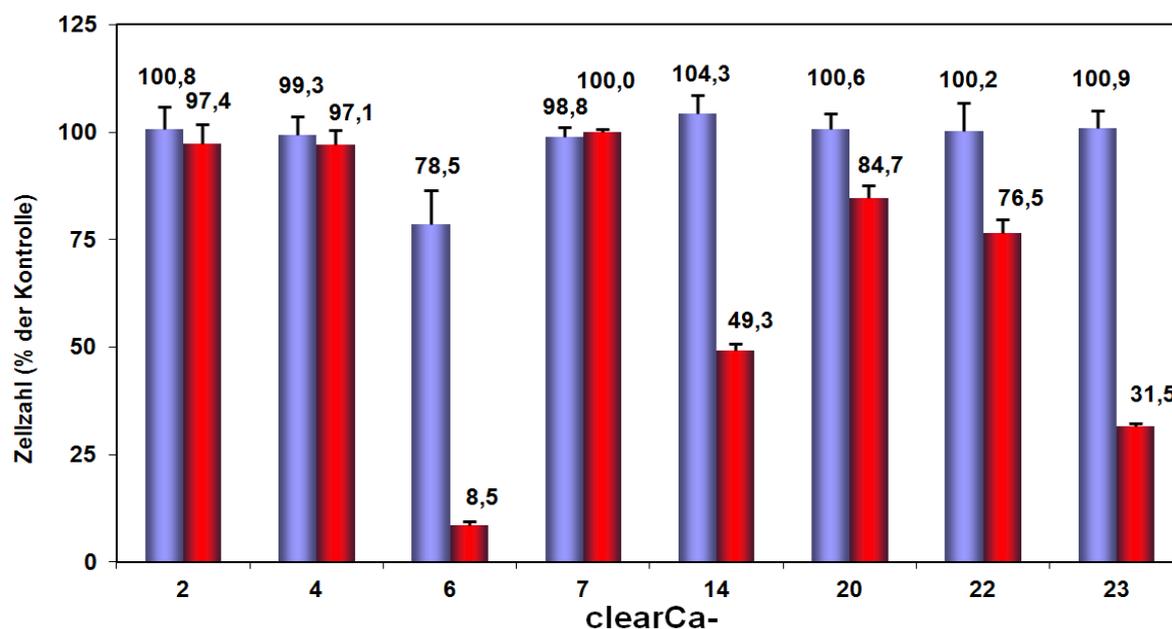


Abb. 4.6: Wachstumsbilanz von Nierenkarzinomzelllinien nach 72-stündiger Exposition mit 10 ng/ml (blaue Säulen) oder 100 ng/ml (rote Säulen) rhs-TRAIL-Liganden. Signifikante Reduktion der Zellzahl nach Exposition mit rhs-TRAIL (100 ng/ml) in clearCa-6 ($p < 0,01$), -14 und -23 ($p < 0,05$). Keine oder geringe Reduktion der Zellzahl in clearCa-2, -4, -7 bzw. clearCa-20 und -22). Angegeben sind jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

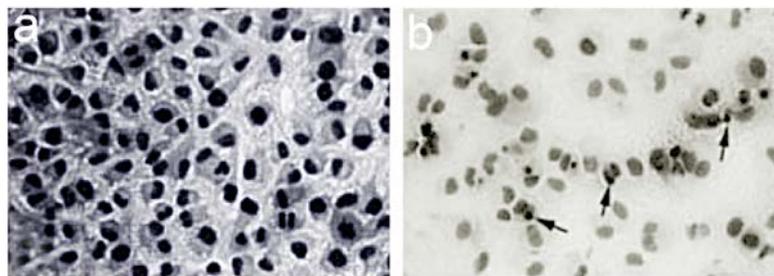


Abb. 4.7: Lichtmikroskopische Aspekte der Zelllinie clearCa-6 vor (a) und nach (b) Exposition mit rekombinatem TRAIL-Liganden (100 ng/ml) – siehe auch Abb. 4.2 (a und e). Deutlicher Anstieg der Apoptosen (Pfeile) bei gleichzeitiger Abnahme der Zelldichte nach Exposition mit TRAIL (b) im Vergleich zur Kontrolle (a)

Zusammenfassend zeigen diese Beobachtungen, dass humane Nierenkarzinomzelllinien trotz der Expression von pro-apoptotischen TRAIL-Todesrezeptoren DR4 und DR5 eine ausgeprägte Resistenz gegenüber einer TRAIL-induzierten Apoptose aufweisen und vielleicht deshalb keine effektive Induktion der Apoptose durch Exposition mit rekombinatem TRAIL-Liganden in der Mehrzahl der Zelllinien möglich ist. Nachfolgend wurde somit die Kombinationswirkung von TRAIL und Bestrahlung im Nierenzellkarzinom untersucht.

4.2.2 Wirkungssteigerung der TRAIL-induzierten Apoptose durch ionisierende Gamma-Strahlung in Nierenkarzinomzelllinien

Um der Frage nachzugehen, ob eine mögliche Verstärkung in der Sensitivität gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose durch eine Bestrahlung mit ionisierender Gamma-Strahlung nachweisbar ist, wurden fünf TRAIL-resistente Zelllinien (clearCa-2, -4, -7, -20 und -22) und eine TRAIL-sensitive Zelllinie (clearCa-6) für die kombinierte Exposition mit rekombinatem TRAIL-Liganden (10 ng/ml) und klinisch relevanten Gamma-Bestrahlungsdosen (1 oder 5 Gy) ausgewählt. In diesen Experimenten führte die kombinierte Behandlung von rhs-TRAIL mit ionisierender Gamma-Strahlung (1 Gy) in lediglich einer (clearCa-22) Nierenkarzinomzelllinie zu einem signifikanten Sensibilisierungseffekt ($p < 0,05$), während in anderen fünf Zelllinien keine (clearCa-2, 4, -6, -20) bis geringe (clearCa-7) Wirkungsverstärkung ($p < 0,05$) nachweisbar waren (Abb. 4.8).

Die verwendete Nierenkarzinomzelllinie clearCa-22 besitzt keine Mutation in den "hot spot" Exons des Tumorsuppressorgens *p53*. Darüber hinaus konnte in dieser Zelllinie eine gesteigerte Proteinexpression des TRAIL-Todesrezeptors DR5 nach Bestrahlung mit ionisierender Gamma-Strahlung nachgewiesen werden (RAMP et al., 2000, 2003).

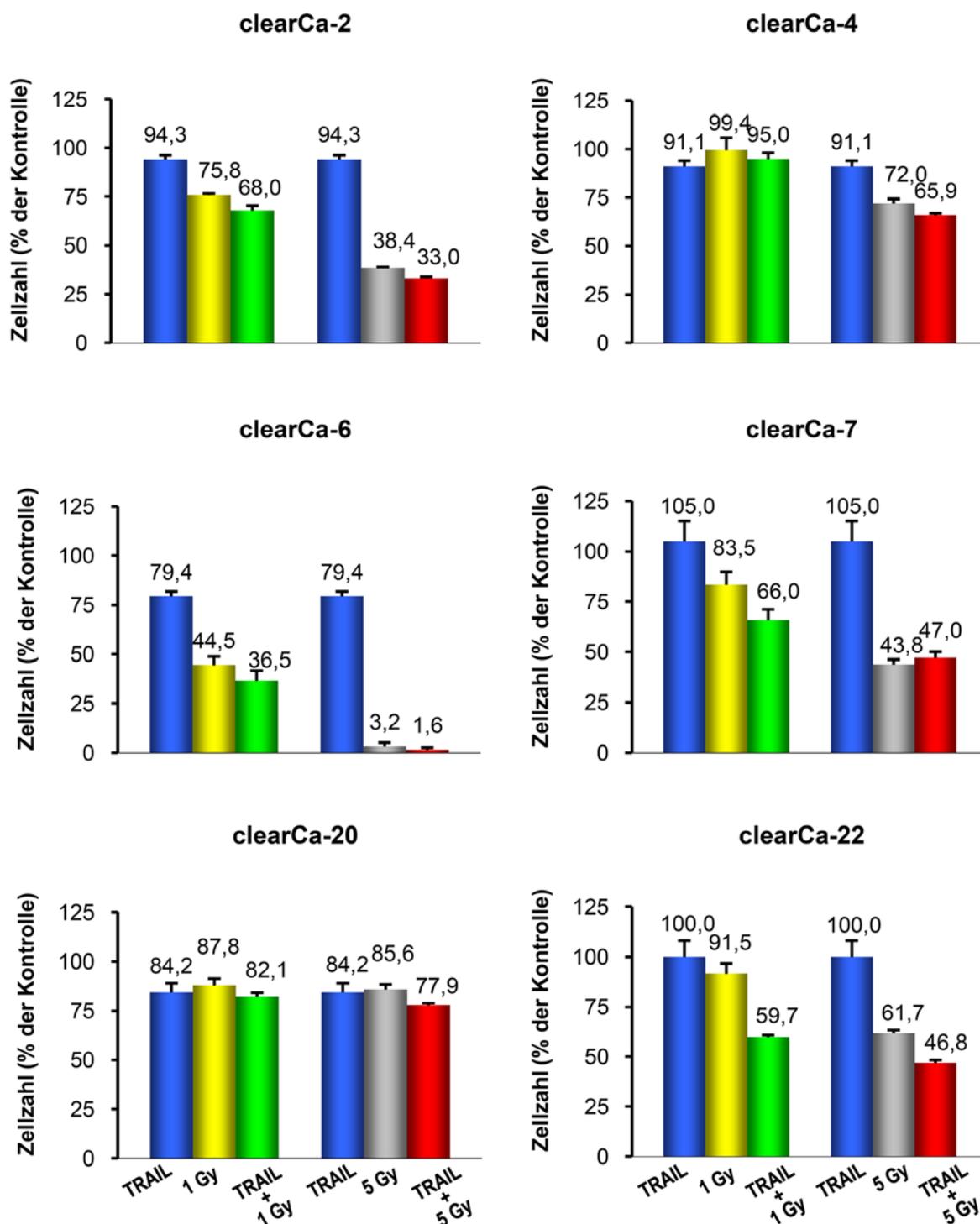


Abb. 4.8: Wachstumsbilanz von Nierenkarzinomzelllinien nach Exposition für 72 Stunden mit rekombinantem TRAIL-Liganden (10 ng/ml, blaue Säulen) und ionisierender Gamma-Strahlung (1 Gy: gelbe Säulen; 5 Gy: graue Säulen) alleine oder in Kombination (10 ng/ml TRAIL + 1 Gy Gamma-Strahlung: grüne Säulen; 10 ng/ml TRAIL + 5 Gy Gamma-Strahlung rote Säulen). Signifikante Sensibilisierung ($p < 0,05$) gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose durch ionisierende Gamma-Strahlung in einer von sechs (clearCa-22) Nierenkarzinomzelllinien und keine oder geringe Sensibilisierungseffekte nach kombinierter Behandlung von rns-TRAIL und ionisierender Gamma-Strahlung in den restlichen Zelllinien. Kombinatorische Effekte von rns-TRAIL wurden bei klinisch relevanten Gamma-Bestrahlungsdosen von 1 oder 5 Gy beobachtet. Angegeben sind jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

4.2.3 Regulation der verstärkten Wirkung der TRAIL-induzierten Apoptose durch ionisierende Gamma-Strahlung in Nierenkarzinomzelllinien

Um der Frage nachzugehen, welche Regulatoren für die beobachtete Wirkungsverstärkung der TRAIL-vermittelten Apoptose durch ionisierende Gamma-Strahlung im Nierenzellkarzinom von funktioneller Bedeutung sein könnten, wurden nach alleiniger und kombinierter Exposition von rhs-TRAIL (10 ng/ml) und einer Bestrahlung mit ionisierender Gamma-Strahlung (1 Gy) in der Zelllinie clearCa-22 eine Reihe von Western Blot Analysen durchgeführt.

Die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) ist ein Zielprotein der Caspasen und darüber hinaus ein Reparaturenzym, das spezifisch an DNA-Strangbrüchen bindet, wie sie unter anderem durch die Einwirkung der Nukleasen bei beginnender Apoptose entstehen (DURIEZ & SHAH, 1997). In der Exekutionsphase der Apoptose wird das intakte PARP-Protein (116 KDa) durch proteolytische Prozessierung durch Caspasen in ein Fragment von 85 KDa gespalten. Diese für die Apoptose spezifische Spaltung wird für den Nachweis der Apoptose-Induktion verwendet. Auf diese Weise kann man Apoptosen eindeutig von Nekrosen unterscheiden, da die proteolytische Spaltung von PARP nur beim apoptotischen Zelltod auftritt.

Die durchgeführte Western Blot Analyse ergab eine deutliche Zunahme in der Spaltung von *PARP* in sein charakteristisches Fragment (*p85*) nach kombinierter Exposition von clearCa-22 mit rhs-TRAIL und ionisierender Gamma-Strahlung, während die alleinige Exposition mit rhs-TRAIL oder ionisierender Gamma-Strahlung zu keiner gesteigerten Niveaus der PARP-Spaltung führte (Abb. 4.9a). Diese mit dem gezeigten Expressionsanstieg des DR5-Rezeptors im Einklang stehende Beobachtung weist auf eine stark vermehrte Induktion der TRAIL-vermittelten Apoptose durch ionisierende Gamma-Strahlung in der Zelllinie clearCa-22 hin.

Darüber hinaus zeigten die durchgeführten Western Blot Untersuchungen eine gesteigerte Spaltung und somit ebenfalls eine deutliche Aktivierung der *Effektor-Caspase-3* nach kombinierter Exposition von clearCa-22 mit rhs-TRAIL und ionisierender Gamma-Strahlung, während die alleinige Exposition mit rhs-TRAIL oder ionisierender Gamma-Strahlung keine (rhs-TRAIL) oder nur eine schwache Caspase-3-Spaltung (ionisierende Gamma-Strahlung) induzierte (Abb. 4.9b). Dagegen war die Spaltung der *Effektor-Caspase-6* und *-7* nicht nachweisbar (Abb. 4.9c, d).

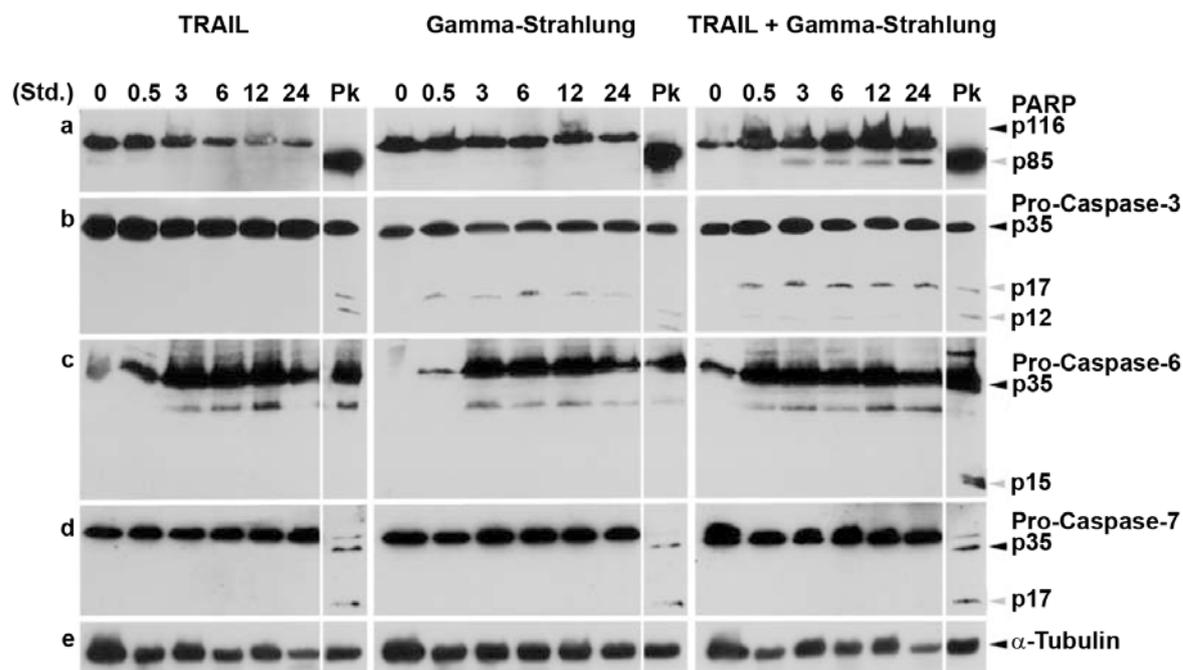


Abb. 4.9: Western Blot Analyse von PARP und den Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 nach Exposition von clearCa-22 mit rhs-TRAIL (10 ng/ml) und Gamma-Strahlung (1 Gy) alleine oder in Kombination. Deutliche Spaltung von PARP in sein Fragment (p85; a) sowie von Pro-Caspase-3 in ihre aktiven Fragmente (p17/p12; b) nach kombinierter Behandlung mit rhs-TRAIL und ionisierender Gamma-Strahlung. Keine Spaltprodukte von PARP und Pro-Caspase-3 nach alleiniger Exposition mit rhs-TRAIL oder ionisierender Gamma-Strahlung. Keine Spaltprodukte von Pro-Caspase-6 (p15; c) und -7 (p17; d) nach Exposition mit rhs-TRAIL oder ionisierender Gamma-Strahlung alleine oder in Kombination. Die Spaltung von PARP und den Pro-Caspasen-3, -6 und -7 in J16-Zellen nach Exposition mit CD95-agonistischen CH11-Antikörpern (500 ng/ml) wurde als Positivkontrolle (Pk) verwendet. Die Expression von α -Tubulin zeigt das Auftragen vergleichbarer Proteinmengen (e)

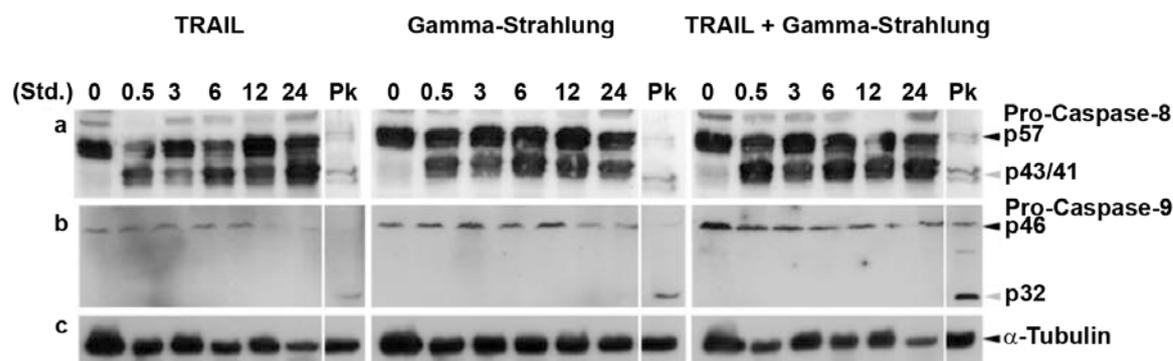


Abb. 4.10: Western Blot Analyse der Initiator-Caspase-8 und -9 nach Exposition von clearCa-22 mit rhs-TRAIL (10 ng/ml) und ionisierender Gamma-Strahlung (1 Gy) alleine oder in Kombination. Deutliche Spaltung von Pro-Caspase-8 in ihre aktiven Fragmente (a; p43/p41) nach Exposition mit rhs-TRAIL oder ionisierender Gamma-Strahlung alleine oder in Kombination. Keine Spaltprodukt von Pro-Caspase-9 (p32; b) nach Exposition mit rhs-TRAIL oder ionisierender Gamma-Strahlung alleine oder in Kombination. Die Spaltung von Pro-Caspasen-8 und -9 in J16-Zellen nach Exposition mit CD95-agonistischen CH11-Antikörpern (500 ng/ml) wurde als Positivkontrolle (Pk) verwendet. Die Expression von α -Tubulin zeigt das Auftragen vergleichbarer Proteinmengen (c)

Die Sensibilisierung gegenüber der beobachteten Apoptose-Induktion nach kombinierter Exposition mit rhs-TRAIL und ionisierender Gamma-Strahlung könnte auf die gleichzeitige Aktivierung des Caspase-8-vermittelten (extrinsischen) und Caspase-9-vermittelten (intrinsischen) Signalweges der Apoptose zurückzuführen sein. In den nächsten Western Blot Analysen wurde deshalb der Aktivierungszustand dieser unterschiedlichen Apoptosesignalwege in clearCa-22 untersucht.

Wie in Abbildung 4.10a dargestellt, ergab die durchgeführte Western Blot Untersuchung eine gesteigerte Spaltung der *Initiator-Caspase-8* in ihre charakteristischen aktiven Fragmente (*p43* und *p41*) nach Exposition von clearCa-22 mit rhs-TRAIL und/oder ionisierender Gamma-Strahlung. Darüber hinaus ist es wichtig zu beachten, dass die Caspase-8-Aktivierung nach kombinierter Exposition mit rhs-TRAIL und ionisierender Gamma-Strahlung die Effekte jeder alleinigen Behandlung nicht überschritten hat (vgl. Abb. 4.10a), obwohl lediglich die kombinierte Behandlung zu einer gesteigerten Spaltung von Caspase-3 führte (vgl. Abb. 4.9b).

Die Expression des intrazellulären Caspase-8-Inhibitors c-FLIP wurde bereits in verschiedenen Tumormodellen als Grund von Resistenz gegenüber CD95- und TRAIL-vermittelter Apoptose beschrieben (ROTH & REED, 2004). Bei c-FLIP handelt es sich um ein Protein, das in seiner Sequenz der Pro-Caspase-8 ähnelt (IRMLER et al., 1997; WANG et al., 2000). So ist c-FLIP in der Lage, mit der Pro-Caspase-8 um die Bindung ihres Adaptermoleküls FADD zu konkurrieren und so über eine kompetitive Hemmung die Aktivierung der Apoptose-vermittelnden Caspasen-Kaskade zu verhindern. Interessanterweise wurde in diesem Zusammenhang die Expression von *c-FLIP* nach Exposition von clearCa-22 mit rhs-TRAIL oder ionisierender Gamma-Strahlung alleine oder in Kombination deutlich reduziert, was vermutlich zu der beobachteten Aktivierung der Initiator-Caspase-8 beitragen könnte (Abb. 4.11). Dagegen waren keine eindeutigen Unterschiede in der Expression von *FADD* nach Exposition mit rhs-TRAIL und/oder ionisierender Gamma-Strahlung nachweisbar (Abb. 4.11).

Darüber hinaus ergaben die durchgeführten Western Blot Analysen keine Spaltung der Initiator-Caspase-9 und somit - im Gegensatz zur Aktivierung des Caspase-8-Signalweges - keine Aktivierung des Caspase-9-Apoptosesignalweges nach Exposition mit rhs-TRAIL und/oder ionisierende Gamma-Strahlung in der Nierenkarzinomzelllinie clearCa-22 (Abb. 4.10b). Da vorangegangene Untersuchungen die funktionelle Beteiligung des Caspase-9-vermittelten Signalweges an der durch ionisierende Strahlung vermittelten Apoptose in anderen Tumormodellen zeigen konnten (NEWTON & STRASSER, 2000; JOSEPH et al., 2001; RUDNER et al., 2001), könnte die gestörte Aktivierung der Initiator-Caspase-9 zu der wohlbekannteren Resistenz von Nierenzellkarzinomen gegenüber strahlungsvermittelter Apoptose beitragen.

Ferner ergaben die durchgeführten Western Blot Analysen erste Hinweise auf die Mechanismen der fehlenden Aktivierung des Caspase-9-Signalweges im humanen Nierenzellkarzinom. So zeigte sich nach Exposition mit rhs-TRAIL und/oder ionisierender Gamma-Strahlung in clearCa-22 keine Spaltung von *Bid* in seine aktive Form (tBid) (Abb. 4.11), welches das Bindeglied zwischen dem Caspase-8- und Caspase-9-Signalweg der Apoptose-Induktion ist (LI et al., 1998).

Die anti-apoptotische Serin/Threonin-Kinase Akt/PKB (Proteinki kinase B) ist ein weiterer erst in jüngster Zeit identifizierter Regulator der Apoptose, welche durch Phosphorylierung aktiviert wird:

In Prostatakarzinomen entfaltet die phosphorylierte und damit aktive Form der Akt ihre anti-apoptotischen Effekte über eine direkte Hemmung der Bid-Spaltung, was wiederum die Inaktivierung von Caspase-9 zur Folge hat (THAKKAR et al., 2001). Der Ausfall der Bid-Spaltung konnte der Anwesenheit des phosphorylierten Akt-Proteins nicht zugeordnet werden, da dieses weder vor noch nach Exposition mit rhs-TRAIL und/oder ionisierender Gamma-Strahlung in der Nierenkarzinomzelllinie clearCa-22 nachweisbar war (Abb. 4.11).

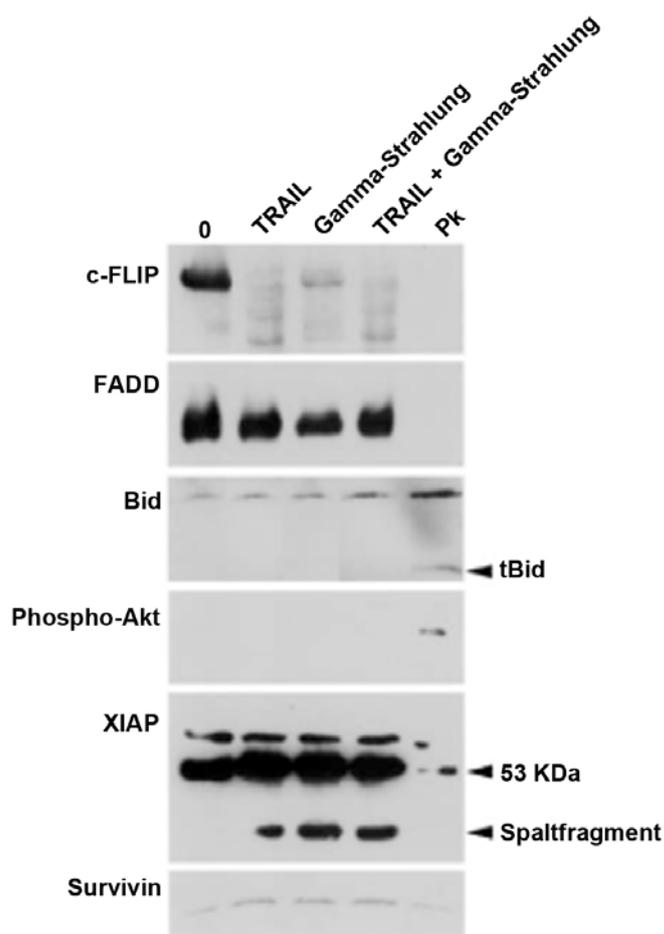


Abb. 4.11: Western Blot Analyse der Apoptose-regulierenden Proteine in clearCa-22 nach Exposition mit rhs-TRAIL (10 ng/ml) und ionisierender Gamma-Strahlung (1 Gy) alleine oder in Kombination. Verringerte Expression von c-FLIP nach Exposition mit rhs-TRAIL und/oder ionisierender Gamma-Strahlung, während die Expression von FADD und Survivin im Vergleich zur Kontrolle (0) unverändert blieb. Keine Spaltung von Bid in sein aktives Spaltfragment tBid und fehlende Expression des aktiven phosphorylierten Akt-Proteins (Phospho-Akt) nach Exposition mit rhs-TRAIL und/oder ionisierender Gamma-Strahlung. Starke Expression des XIAP-Proteins (53 KDa) vor und nach Exposition mit rhs-TRAIL und/oder ionisierender Gamma-Strahlung und Auftreten eines XIAP-Spaltprodukts nach Exposition mit rhs-TRAIL und/oder ionisierender Gamma-Strahlung. Die Spaltung von Bid in sein aktives Spaltprodukt tBid in J16-Zellen nach Exposition mit CD95-agonistischen CH11-Antikörpern (500 ng/ml) diente als Positivkontrolle (Pk). Die Expression des phosphorylierten Akt-Proteins (Phospho-Akt) in PDGF-induzierten NIH3T3-Zellen diente als Positivkontrolle (Pk).

Darüber hinaus wurde eine gesteigerte Expression von XIAP, eines Mitglieds der anti-apoptotischen IAP-Familie, nach Exposition mit rhs-TRAIL und/oder ionisierender Gamma-Strahlung beobachtet (Abb. 4.11), und - noch viel wichtiger - erschien nach Exposition mit rhs-TRAIL und/oder ionisierender Gamma-Strahlung ein Spaltprodukt von XIAP (Abb. 4.11), welches in der Lage ist, spezifisch die Caspase-9-Aktivierung zu inhibieren (DEVERAUX et al., 1999). Dagegen zeigte sich nach Exposition mit rhs-TRAIL und/oder ionisierender Gamma-Strahlung nur geringe Expression von Survivin (Abb. 4.11), welches ebenfalls zur anti-apoptotischen IAP-Familie gehört und spezifisch die Aktivierung von Caspase-3, -7 und -9 inhibieren kann.

5 Diskussion

5.1 Störungen der Apoptoseregulation im humanen Nierenzellkarzinom

Die meisten malignen Tumoren weisen eine außerordentliche Resistenz gegenüber einer Vielzahl apoptotischer Stimuli auf. Dabei sind die genauen Mechanismen, die dieser Resistenz zugrunde liegen, sind bislang nur unvollständig verstanden. Bekannt ist allerdings, dass viele Tumore Störungen im Verlauf der Apoptose aufweisen können. Viele der konventionellen Chemo- und Strahlentherapien wirken aber unzureichend, möglicherweise weil die Tumorzellen eine Resistenz entwickelt haben (LOWE et al., 1993; BROWN & WOUTERS, 1999; ZHIVOTOVSKY et al., 1999; VERHEIJ & BARTELINK, 2000; LOWE, 2000; IGNEY & KRAMMER, 2002; DEBATIN & KRAMMER, 2004; NORBURY & ZHIVOTOVSKY, 2004). Das TRAIL-System wird derzeit jedoch als ein therapeutisch modulierbares Signalweg der Apoptose angesehen und die Chemo- und Strahlentherapieresistenz maligner Tumoren unter anderem durch Fehlregulationen in diesem System erklärt (DEJOSEZ et al., 2000; RAMP et al., 2001, 2003; FULDA & DEBATIN, 2006; HEIKAUS et al., 2007).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte sowohl die Wirkung des geno-toxischen Zytostatikums Topotecan und des rekombinanten humanen löslichen TRAIL-Liganden (rhs-TRAIL) als auch die Kombinationswirkung von rhs-TRAIL und ionisierender Gamma-Strahlung im humanen Nierenzellkarzinom untersucht werden, einem malignen Tumor, der sich ebenfalls durch eine weitgehende Therapie- und Apoptoseresistenz auszeichnet. Hierbei waren zwei grundlegende **Fragen** zu klären: Hängt die Resistenz gegenüber Zytostatika- oder TRAIL-induzierter Apoptose im Nierenzellkarzinom möglicherweise mit einem differentiellen Expressionsstatus Apoptose-relevanter Gene zusammen? Könnte die Apoptoseresistenz dieses malignen Tumors tatsächlich durch eine Kombinationsbehandlung von TRAIL mit ionisierender Gamma-Strahlung überwunden werden?

5.1.1 Identifizierung der potentiell für die Apoptoseresistenz verantwortlichen Gene im humanen Nierenzellkarzinom

In den vorliegenden lichtmikroskopischen Untersuchungen konnte eine enorme Heterogenität in der Sensitivität der Nierenkarzinomzelllinien clearCa-6 und -7 gegenüber einer Topotecan- oder TRAIL-induzierten Apoptose nachgewiesen werden (Abb. 4.1 und 4.2). Dabei führten beide Substanzen zu einer signifikanten Hemmung des Zellwachstums in der Zelllinie clearCa-6, was mit einem massiven Anstieg von apoptotischen Figuren wie Chromatinkondensation und Zellschrumpfung einherging. Die Zelllinie clearCa-7 hingegen hat sich weitgehend Topotecan- und TRAIL-resistent erwiesen. Daraufhin wurde auf die Frage eingegangen, welche Gene möglicherweise für diese außerordentlich heterogene Apoptosesensitivität des Nierenzellkarzinoms verantwortlich sein könnten. Zur Beantwortung dieser Frage wurden die Expressionsänderungen von 205 Apoptose-relevanten Genen nach Topotecan- oder TRAIL-Exposition in den verwendeten Zelllinien mit Hilfe eines cDNA-Microarrays vergleichend analysiert und die Ergebnisse exemplarisch für einzelne Transkripte mittels Northern Blots überprüft (Tab. 4.1, Abb. 4.3, 4.4 und 4.5).

Genexpressionsprofile der Apoptose-sensitiven Nierenkarzinomzelllinie clearCa-6

In der Apoptose-sensitiven Zelllinie zeigte die vorliegende Untersuchung eine p53- und E2F1-abhängige Genexpression - ähnlich wie diese auch nach DNA-Schädigung zu beobachten ist - nicht nur nach Gabe von Topotecan, sondern auch nach Exposition mit TRAIL (Tab. 4.1, Abb. 4.4a, b). Somit führten beide Substanzen zu einer differentiellen Expression von zahlreichen p53- und E2F1-Zielgenen, die funktionell an der Regulation von Zellproliferation (WU et al., 2001) und Apoptose beteiligt sind (WU & LEVIN, 1994; QIN et al., 1994; SHAN et al., 1994; KOWALIK et al., 1995; DEGREGORIE et al., 1997; KOWALIK et al., 1998; PEDICONI et al., 2003; DIMOVA & DYSON, 2005).

Mit Ausnahme von einzelnen Ähnlichkeiten waren Expressionsprofile der nach DNA-Schädigung transkriptionell von p53 und E2F1 induzierbaren Gene nach Behandlung mit Topotecan und TRAIL nicht identisch. Ein Beispiel hierzu ist der unterschiedliche Expressionsstatus der p14^{ARF}-Transkripte. Es ist bekannt, dass die p14^{ARF}-Transkription bei einer Aktivierung von E2F1 induziert wird (ZINDY et al., 1998; LINDSTROM et al., 2003), während das Wildtyp-p53-Produkt die Transkription aus dem ARF-Promotor verhindern kann (ROBERTSON & JONES, 1998). Die vorliegende Untersuchung zeigte nach TRAIL-Exposition eine unveränderte bzw. nach Topotecan-Exposition eine erhöhte p14^{ARF}-mRNA-Expression in der sensitiven Zelllinie, was darauf hin deutet, dass die E2F1-regulierte Geninduktion möglicherweise eine dominierende Rolle in der Topotecan-vermittelten Apoptose-Induktion gespielt hat.

Darüber hinaus zeigte sich ein bemerkenswerter Unterschied zwischen TRAIL- und Topotecan-vermitteltem Genexpressionsmuster bei den Genen *p21* und *GADD45*, welche funktionell an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind. Während der CDK2-Inhibitor p21 für die Aufrechterhaltung des G1-Zellzyklusarrests von entscheidender Bedeutung ist (AGAMI et al., 2000), nimmt das Stressprotein GADD45 im G2-Zellzyklusarrest eine zentrale Stellung ein (HOLLANDER et al., 1993; MAEDA et al., 2002). In den vorliegenden Untersuchungen führte Topotecan zu einer deutlichen Zunahme der p21-Transkription, wohingegen TRAIL diese reduzierte. Darüber hinaus führten sowohl Topotecan als auch TRAIL zu einer verstärkten Induktion der GADD45-Transkription. Diese Ergebnisse deuten auf eine Beeinträchtigung der Progression in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus nach Behandlung mit Topotecan hin, während TRAIL überwiegend die Progression in der G2-Phase des Zellzyklus verhindert. Weitere Unterschiede in der p53- und E2F1-vermittelten Genexpression nach Exposition mit TRAIL oder Topotecan konnten ferner durch die unterschiedliche Expression von *MDM2*, *p73*, *PCNA* und *Cyclin E* nachgewiesen werden (Tabelle 4.1).

Die biologische Funktion eines pro-apoptotischen Genproduktes kann über eine Heterodimerisierung mit seinem anti-apoptotischen Gegenstück (Antagonisten) aufgehoben werden (GROSS et al., 1999). So können die anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie wie Bcl-2, Bcl-w oder Bcl-2A1 die Funktion ihrer pro-apoptotischen Familienmitglieder wie BNIP3 (Bcl-2/adenovirus E1B 19 KDa interacting protein) aufheben (VAN DELFT & HUANG, 2006). Weitere wichtige Beispiele hierfür sind Caspasen, deren pro-apoptotische Wirkung von den Mitglieder der IAP-Familie wie XIAP und IAP1 inhibiert werden können (WRZESIEN-KUS et al., 2004). Im Gegensatz dazu kann jedoch die anti-apoptotische Funktion von z.B. Bcl-2 über eine gegenseitige Wechselwirkung mit Bag-1 (BCL2-associated athanogene), einem weiteren anti-apoptotischen Protein, verstärkt werden (TAKAYAMA et al., 1995). Mit Bax ist allerdings ein wichtiger pro-

apoptotischer Faktor der Bcl-2-Familie bekannt, der die anti-apoptotische Wirkung von Bcl-2 antagonisieren und dadurch zur Induktion der Apoptose beitragen kann (OLTVAI et al., 1993). Ferner ist das Bak-Protein ein weiteres pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie, das über eine Interaktion mit anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie wie Bcl-X_L, Bcl-2 und Mcl-1 an der Induktion der Apoptose beteiligt sein kann (Chittenden et al., 1995). Das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Genprodukten der Bcl-2-Familie scheint somit für das Schicksal der Zelle von entscheidender Bedeutung zu sein.

Daher wurden nicht nur die pro-apoptotischen Gene, sondern auch viele anti-apoptotischen Gene wie *NF-κB* in der Apoptose-sensitiven Zelllinie clearCa-6 nach Behandlung mit TRAIL oder Topotecan zur Expression in den vorliegenden Untersuchungen induziert. Es ist bekannt, dass E2F1 in der Lage ist, die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB zu blockieren (PHILLIPS et al., 1999; STANELLE et al., 2002; TANAKA et al., 2002). Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren, dass trotz der Beobachtung einer verstärkten Hochregulation der *E2F1*-mRNA-Expression auch die wichtigsten anti-apoptotischen NF-κB-Zielgene wie *Bcl-2A1* und *IAP1* nach Exposition mit TRAIL bzw. *Bcl-2A1*, *c-FLIP* und *IAP1* nach Behandlung mit Topotecan in der sensitiven Zelllinie transkriptionell induziert werden konnten (Abb. 4.4a, b). Somit lassen diese Befunde die Existenz "kontra-regulativer" anti-apoptotischer Kontrollmechanismen vermuten, die der Aktivierung pro-apoptotischer Signalwege entgegenstehen. Allerdings war die transkriptionelle Hochregulation der untersuchten anti-apoptotischen Genprodukte offenbar nicht ausreichend, um eine TRAIL- oder Topotecan-induzierte Apoptose in der sensitiven Nierenkarzinomzelllinie zu verhindern.

Die Anzahl der p53- und E2F1-hochregulierten Zielgene in der Apoptose-sensitiven Zelllinie impliziert, dass die p53- und E2F1-vermittelte transkriptionelle Antwort nicht nur für die Topotecan-induzierte Apoptose von Bedeutung ist, sondern auch für die TRAIL vermittelte Apoptose. Diese *de novo*-Induktion der pro-apoptotischen p53- und E2F1-Zielgene durch TRAIL in der sensitiven Zelllinie deutet darauf hin, dass neben der klassischen Caspasen-Kaskade vermutlich auch andere pro-apoptotische Signalwege an der TRAIL-vermittelten Apoptose-Induktion im Nierenzellkarzinom beteiligt sind. Einer dieser TRAIL-induzierten, "Caspase-unabhängig" vermittelten apoptotischen Signalwege könnte die Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies sein (LEE et al., 2002). Da das Entgiftungsenzym Glutathionperoxidase die Zelle vor oxidativem Stress schützt, könnte die starke Induktion des zugehörigen Gens *GPX1* durch TRAIL (jedoch nicht durch Topotecan) in den vorliegenden Untersuchungen ein indirekter Hinweis auf eine derartige Aktivierung von reaktiven Sauerstoffspezies sein. Darüber hinaus könnte die TRAIL-induzierte Aktivierung der Gen-Cluster, ähnlich wie diese auch bei DNA-Schäden zu beobachten ist, darauf hindeuten, dass TRAIL selbst in der Lage ist, erhebliche DNA-Schäden in sensitiven Zelllinien zu induzieren.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass die beobachtete gleichzeitige Hochregulation von pro- und anti-apoptotischen Faktoren einen Konflikt zwischen Leben und apoptotischem Sterben innerhalb der Zelle widerspiegelt - mit einem Überwiegen zugunsten der Apoptose in der sensitiven Zelllinie. Mögliche Erklärungen für die Dominanz der Apoptose könnten die "unzureichende" oder "zu späte" Induktion der anti-apoptotischen Gene in einer über eine intakte Todesmaschinerie verfügende Zelle sein.

Genexpressionsprofile der Apoptose-resistenten Nierenkarzinomzelllinie clearCa-7

Im Gegensatz zu der Apoptose-sensitiven Nierenkarzinomzelllinie clearCa-6 wurde in der Apoptose-resistenten Zelllinie clearCa-7 nur eine kleine Anzahl von Genen differentiell reguliert. So zeigte nur *GADD45* eine starke Induktion nach Exposition mit Topotecan. Ferner war eine leichte Induktion der einzelnen Gene nachweisbar. Die meisten Gene hingegen wurden nicht differentiell exprimiert (Abb. 4.5c, d). Interessanterweise wurden von diesen Genen die anti-apoptotischen Gene *XIAP* und *Bcl-w* nach Exposition mit TRAIL oder Topotecan in der resistenten Zelllinie nur geringfügig exprimiert, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass *XIAP* und *Bcl-w* keinen wesentlichen Einfluss auf die Apoptoseresistenz von Nierenzellkarzinomen haben. Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang außerdem, dass weder eine verstärkte Zunahme von anti-apoptotischen Genen noch eine verminderte Expression von pro-apoptotischen Genen "als Mechanismen der Apoptoseresistenz" nach Exposition mit TRAIL oder Topotecan zu verzeichnen war. Die Mechanismen der Apoptoseresistenz der Nierenkarzinomzelllinien scheinen somit - zumindest teilweise - oberhalb der transkriptionellen Aktivierung lokalisiert zu sein. Darüber hinaus deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass die Mechanismen der Apoptoseresistenz scheinbar nicht "erworben" oder durch Behandlung mit TRAIL oder Topotecan induziert werden, sondern die Apoptoseresistenz scheint vielmehr charakteristisch eine phänotypische Eigenschaft der resistenten Zellen zu sein. Mit Ausnahme von transkriptioneller Regulation können somit diese Resistenzmechanismen auf anderen Ebenen der Zelle lokalisiert sein.

Bezüglich des Zytostatikums Topotecan kann eine Beeinträchtigung des aktiven und passiven zellulären Aufnahmemechanismus zu einer insuffizienten Akkumulation des Zytostatikums in den Tumorzellen führen (DANKS et al., 1997; HUMERICKHOUSE et al., 2000; KHANNA et al., 2000). Insbesondere ABC-Transportersysteme (ATP-binding cassette), wie z.B. MDR1 (Multidrug Resistance) und MRP2 (Multidrug Resistance-Related Protein), sind dafür bekannt, an aktivem zellulären Effluxmechanismus beteiligt zu sein (CHEN et al., 1991). Eine Resistenzentwicklung gegenüber Zytostatika ähnlich dem ABC-Mechanismus, während der Therapie mit Topotecan, ist bislang nicht bekannt (HSIANG et al. 1985). Ferner kann eine Resistenz gegenüber Zytostatika auch durch eine Fehlaktivierung des Tumorsuppressorgens *p53* bedingt sein. Die durch DNA-Schädigung induzierten Proteinkinasen der ATM-Familie könnten mutiert oder gehemmt sein oder aber völlig fehlen, sodass das apoptotische Signal nicht auf den Tumorsuppressor *p53* weitergeleitet wird. Darüber hinaus könnte eine Überexpression der zelleigenen *p53*-Inhibitoren MDM2 und MDMX (WARBURTON et al., 2005) oder ein Verlust der transkriptionellen Koaktivatoren von *p53* wie JMY (Junction-Mediating and Regulatory Protein, *p53*-Kofaktor) oder STRAP (Serine/Threonine Kinase Receptor Associated Protein (COUTTS et al., 2005) auch zu einer ineffektiven *p53*-abhängigen Genaktivierung beitragen.

Bezüglich einer TRAIL- oder Topotecan-abhängigen Apoptose könnten die durch Mutationen oder post-translationalen Modifikationen wie Phosphorylierung oder Ubiquitylierung funktionell beeinträchtigten pro-apoptotischen Proteine die extrinsischen und intrinsischen Signalwege der Apoptose stören, und die Störungen dieser apoptotischen Signalwege könnten auch die primären Ziele von Zytostatika wie die TRAIL-Rezeptoren und die Topoisomerase-I (TSURUTANI et al., 2002) sowie die Caspasen oder die Adaptermolekülen (wie z.B. FADD) betreffen.

Zusammenfassend zeigen die erzielten Ergebnisse, dass die TRAIL-Sensitivität oder Zytostatika-Sensitivität der Tumorzellen mit einer transkriptionellen Hochregulation einer Vielzahl von pro-apoptotischen Genen einhergeht. Die Mechanismen der Apoptoseresistenz sind hierbei - zumindest zum Teil - oberhalb der transkriptionellen Geninduktion lokalisiert und scheinen von einer *de novo* Synthese anti-apoptotischer Genprodukte oder einer Abnahme pro-apoptotischer Genprodukte weitgehend unabhängig zu sein, wie MAHOTKA et al. (2002) bereits für die Expression einer Spleißvariante des Apoptose-Inhibitors Survivin durch die Blockade der *de novo* Translation durch die Gabe von Cycloheximid gezeigt haben. Die Phänotypen "Apoptose-sensitiv" oder "Apoptose-resistent" scheinen somit vielmehr die charakteristischen Eigenschaften der Tumorzellen zu sein. Der apoptotische Stimulus, vermittelt extrinsisch (über die Stimulation von Todesrezeptoren) oder intrinsisch (über die Aktivierung des DNA-Schaden-Signalweges), ist daher mit einem zellulären Umfeld konfrontiert, in dem das apoptotische Signal an die Todesmaschinerie der Zelle weitergeleitet werden kann (sensitiv) oder nicht (resistent). Somit erscheint es wahrscheinlich, dass die in der sensitiven Zelllinie beobachtete starke differentielle Genexpression lediglich eine zelluläre Reaktion auf die aktivierte Todesmaschinerie darstellt, wohingegen in der resistenten Zelllinie das Apoptosesignal nicht weitergeleitet werden kann und somit lediglich eine geringfügig veränderte Genexpression der Zelle vorhanden ist.

5.1.2 Kombinationswirkung von TRAIL und ionisierender Gamma-Strahlung

Nach heutiger Vorstellung nimmt man an, dass die Strahlentherapie mit ionisierender Gamma-Strahlung ihre Wirkung - zumindest teilweise - über eine Aktivierung der Apoptose in Tumorzellen entfaltet (BROWN & WOUTERS, 1999; ZHIVOTOVSKY et al., 1999; NEWTON & STRASSER, 2000; VERHEIJ & BARTELINK, 2000). Wie bereits dargestellt, konnte vor kurzem nachgewiesen werden, dass insbesondere Tumorzellen für die Apoptose-induzierende Wirkung von TRAIL empfänglich sind, während sich die meisten normalen Zellen als weitgehend TRAIL-resistent erwiesen haben. Somit könnte dieser Ligand in Kombination mit ionisierender Strahlung zur Behandlung maligner Tumore eingesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Frage nachgegangen, ob eine Kombinationstherapie von rekombinantem humanem löslichem rhs-TRAIL und einer Bestrahlung mit ionisierender Gamma-Strahlung tatsächlich die klinisch bekannte Apoptoseresistenz des humanen Nierenzellkarzinoms überwinden kann.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine Koexpression der Apoptose-induzierenden TRAIL-Todesrezeptoren DR4 und DR5 in allen untersuchten Nierenkarzinomzelllinien. Darüber hinaus war nach Exposition mit TRAIL in drei der 8 Zelllinien eine deutliche Apoptose-Induktion fassbar. Diese Beobachtung ist insofern wichtig, da sie auf die Existenz eines funktionell aktiven apoptotischen Selbstmordmechanismus in einem erheblichen Anteil der Nierenzellkarzinome hinweist. Eine adäquate Stimulation vorausgesetzt, ist also eine Erhöhung der Sensitivität gegenüber schwachen Stimuli möglich. Obwohl Apoptose-induzierende TRAIL-DR4- und DR5-Rezeptoren in allen Nierenkarzinomzelllinien vorhanden sind, gelang es den klinisch relevanten Bestrahlungsdosen von ionisierender Gamma-Strahlung in Kombination mit TRAIL-Behandlung nicht, das apoptotische Ansprechen in den meisten Zelllinien zu erhöhen. Somit war nach kombinierter Behandlung mit ionisierender Gamma-Strahlung und TRAIL lediglich in einer (clearCa-22) der untersuchten

Zelllinien ein signifikanter Sensibilisierungseffekt mit deutlicher Steigerung der Apoptose nachweisbar. Diese Beobachtungen standen in deutlichem Gegensatz zu den jüngsten Arbeiten, in denen über eine synergistische Wirkungssteigerung der Apoptose nach Kombination von TRAIL mit ionisierender Gamma-Strahlung in Zelllinien des Mama- und Kolonkarzinoms (CHINNAIYAN et al., 2000; RAVI et al., 2001) sowie in Jurkat-Lymphomzellen (GONG & ALMASAN, 2000; BELKA et al., 2001; DI PIETRO et al., 2001; KIM et al., 2001a) berichtet wurde. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass nur Kurzzeiteffekte, d.h. Effekte, die innerhalb von 72 Stunden nach einer Kombinationsbehandlung mit TRAIL und ionisierender Gamma-Strahlung eingetreten waren, in den vorliegenden Untersuchungen erfasst wurden. Mögliche Langzeiteffekte von ionisierender Gamma-Strahlung wurden nicht untersucht.

Wirkungsverstärkung der TRAIL-induzierten Apoptose durch Gamma-Strahlung

Zum heutigen Zeitpunkt sind viele Fragen zu den Mechanismen, welche die ausgeprägte Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung des Nierenzellkarzinoms bestimmen, noch weitgehend ungeklärt. Man vermutet jedoch, dass eine durch ionisierende Strahlung induzierte Apoptose ein intaktes p53-Gen erfordert (LOWE et al., 1993). Diesbezüglich wurde beschrieben, dass der beobachtete synergistische Effekt von TRAIL und ionisierender Strahlung an Mammakarzinomen nur in Abhängigkeit eines p53-Wildtypstatus nachweisbar war (CHINNAIYAN et al., 2000). Ein möglicher Mechanismus zur Förderung der synergistischen Wirkung von TRAIL und ionisierender Strahlung könnte in der p53-abhängig induzierbaren Hochregulation des DR5-Rezeptors liegen. (YU et al., 1999). Tatsächlich führte eine Bestrahlung mit ionisierender Gamma-Strahlung zu einem Anstieg der Proteinexpression des DR5-Rezeptors in clearCa-22 (ohne Mutation in den p53-kodierenden Regionen), wodurch diese Zelllinie möglicherweise empfindlicher gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose wurde. Im Gegensatz zu den beobachteten Effekten an Zelllinien des Kolonkarzinoms (RAVI et al., 2001) und an verschiedenen Klonen von Jurkat-Lymphomzellen (BELKA et al., 2001; KIM et al., 2001a) war das Gesamtniveau der Apoptose-Induktion in clearCa-22 nach Kombinationsbehandlung mit TRAIL und ionisierender Gamma-Strahlung eher gering, wobei die maximale Abnahme der Zellzahl bei etwa 46% der Kontrolle lag.

Regulation der Wirkungsverstärkung TRAIL-induzierter Apoptose durch Gamma-Strahlung

Nach heutigem Kenntnisstand kann die Apoptose über mindestens zwei verschiedene (extrinsische und intrinsische), jedoch miteinander in Verbindung stehende Signalwege induziert werden, welche die verschiedenen Initiator-Caspasen, insbesondere der Caspase-8 und -9, aktivieren. Die Caspase-8- und die Caspase-9 Signalwege der Apoptose führen letztlich zur Aktivierung der Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 und somit zum apoptotischen Tod der Zelle. Die gleichzeitige Aktivierung extrinsischer und intrinsischer Signalwege der Apoptose kann zu einer deutlichen Verstärkung des ursprünglichen Apoptosesignals führen (LI et al., 1998; BELKA et al., 2000, 2001; SULIMAN et al., 2001; JOSEPH et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Aktivierungsstatus dieser beiden apoptotischen Hauptsignalwege in clearCa-22 nach Exposition mit TRAIL und/oder einer Bestrahlung mit ionisierender Gamma-Strahlung untersucht. Hierbei zeigte sich eine proteolytische Spaltung und damit eine deutliche Aktivierung der Caspase-3 in clearCa-22 nur nach einer Kombinationsbehandlung mit TRAIL und ionisierender Gamma-Strahlung, wohingegen eine alleinige Behandlung mit TRAIL oder ionisierender Strahlung zu keiner oder nur sehr

geringer Spaltung der Caspase-3 führte. Dementsprechend war eine proteolytische Spaltung von PARP, einem Substrat der aktiven Caspase-3 (YANG et al., 2001) in clearCa-22 nur nach Kombinationsbehandlung mit TRAIL und ionisierender Strahlung nachweisbar. Eine Aktivierung der Caspase-3, deren funktionelle Beteiligung an der durch TRAIL und Bestrahlung induzierten Apoptose bereits bei anderen Tumortypen gezeigt werden konnte (GONG & ALMASAN, 2000; YAMANAKA et al., 2000; BELKA et al., 2001; JOSEPH et al., 2001, 2002; KIM et al., 2001a; NIMMANAPALLI et al., 2001; RUDNER et al., 2001; SULIMAN et al., 2001; SUN et al., 2001; JOSEPH et al., 2002), war somit auch im Nierenzellkarzinom nachweisbar. Im Gegensatz zu anderen Tumortypen (COELHO et al., 2000; SUN et al., 2001; YANG et al., 2001) war im Nierenzellkarzinom jedoch keine proteolytische Spaltung der Effektor-Caspasen-6 und -7 zu verzeichnen.

Da die Aktivierung der Caspase-3 sowohl über Caspase-8 als auch über Caspase-9 und auf diese Weise über die extrinsischen und intrinsischen Signalwege der Apoptose erfolgen kann, wurde weiterhin die funktionelle Beteiligung dieser unterschiedlichen Apoptose-Signalwege analysiert. Hierbei konnte nach Exposition mit TRAIL und einer Bestrahlung mit ionisierender Gamma-Strahlung alleine oder in Kombination eine starke proteolytische Spaltung der Initiator-Caspase-8 in clearCa-22 nachgewiesen werden. Somit stehen diese Ergebnisse im Einklang mit anderen Berichten, in denen eine Caspase-8-Spaltung nach Exposition mit TRAIL oder einer Bestrahlung mit ionisierender Gamma-Strahlung an Nierenzellkarzinomen (PAWLOWSKI et al., 2000) und vielen anderen Tumoren, wie z.B. dem Leber-, Prostata- und Lungenkarzinom (YAMANAKA et al., 2000; NIMMANAPALLI et al., 2001; SUN et al., 2001) und den Jurkat-Lymphomzellen (GONG & ALMASAN, 2000; BELKA et al., 2001; KIM et al., 2001a; RUDNER et al., 2001; SULIMAN et al., 2001), beobachtet wurde.

Die Aktivierung der Caspase-8 durch TRAIL-Liganden oder durch Bestrahlung mit ionisierender Gamma-Strahlung scheint ein gemeinsames Reaktionsmuster in einer Vielzahl verschiedener Tumortypen, einschließlich des Nierenzellkarzinoms, zu sein. Dabei ist besonders bemerkenswert, dass sich in clearCa-22 nach Exposition mit TRAIL und/oder ionisierender Gamma-Strahlung eine deutliche Herunterregulation des Caspase-8-Inhibitors c-FLIP (IRMLER et al., 1997) zeigte. Obwohl die Bedeutung von c-FLIP für die Hemmung der TRAIL-induzierten Apoptose kontrovers diskutiert wird (GRIFFITH et al., 1998; PAWLOWSKI et al., 2000; WANG et al., 2000; MITSIADES et al., 2001), deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass eine verminderte Expression des c-FLIP-Proteins möglicherweise an der Aktivierung der Caspase-8 im Nierenzellkarzinom beteiligt ist. Eine Aktivierung der Initiator-Caspase-9 nach Exposition mit TRAIL oder ionisierender Strahlung konnte bereits an Prostata- und Lungenkarzinomen (NIMMANAPALLI et al., 2001; JOSEPH et al., 2001; SUN et al., 2001), Ewing-Sarkomen (MITSIADES et al., 2001) und Jurkat-Lymphomzellen (KIM et al., 2001a; RUDNER et al., 2001) gezeigt werden. Im Gegensatz dazu war keine proteolytische Spaltung der inaktiven Pro-Caspase-9 in aktive Caspase-9 nach Gabe von TRAIL und/oder Bestrahlung mit ionisierender Gamma-Strahlung in clearCa-22 nachweisbar. Die Weiterleitung des apoptotischen Signals über den "mitochondrialen" Caspase-9-Signalweg der Apoptose scheint daher im Nierenzellkarzinom blockiert zu sein. Zudem legt die vorliegende Untersuchung nahe, dass eine fehlende proteolytische Spaltung von Bid zum Ausbleiben der Caspase-9-Aktivierung beitragen könnte. So ist es bekannt, dass aktive Caspase-8 in der Lage ist, Bid durch Prozessierung in "trunkiertes" Bid (tBid) zu spalten, welches zu den Mitochondrien transloziert und dort schließlich die Freisetzung

von Cytochrom *c* und eine Aktivierung der Initiator-Caspase-9 sowie der Effektor-Caspase-3 bewirkt (LI et al., 1998; BELKA et al., 2001; KIM et al., 2001a; NIMMANAPALLI et al., 2001; SULIMAN et al., 2001). Nach heutiger Vorstellung glaubt man, dass diese Verbindung zwischen den Caspase-8- und Caspase-9-vermittelten Signalwegen über Bid zu einer Signalverstärkung des ursprünglichen Apoptose-Signals führt (SCAFFIDI et al., 1998). In clearCa-22 war jedoch nach Exposition mit TRAIL und/oder Bestrahlung mit ionisierender Gamma-Strahlung - trotz proteolytischer Spaltung von Caspase-8 und Caspase-3 - keine Bid-Spaltung nachweisbar. Ein weiterer kürzlich identifizierter Regulator von Caspase-9 und Bid ist Akt/PKB (Proteinkinase B), eine Serin/Threonin-Kinase, die durch Phosphorylierung aktiviert wird. Interessanterweise wurde für Prostatakarzinomzellen eine Korrelation zwischen der aktivierten Akt und TRAIL-Resistenz beschrieben (THAKKAR et al., 2001). Akt entfaltet ihre anti-apoptotischen Effekte sowohl über die Caspase-9-Inaktivierung durch Phosphorylierung als auch über direkte Hemmung der Bid-Spaltung (THAKKAR et al., 2001). In clearCa-22 hingegen war weder vor noch nach Exposition mit TRAIL und/oder Bestrahlung mit ionisierender Gamma-Strahlung eine Expression der aktiven Form von Akt nachweisbar. Im Gegensatz zu anderen Tumortypen scheint daher im Nierenzellkarzinom die Proteinkinase Akt von untergeordneter Bedeutung für die Blockierung der Bid-Spaltung und die Hemmung der Caspase-9-Aktivierung zu sein.

Darüber hinaus konnte in der Nierenkarzinomzelllinie clearCa-22 eine hohe Grundexpression des anti-apoptotischen XIAP-Proteins nachgewiesen werden. Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang, dass nach Exposition mit TRAIL und/oder Bestrahlung mit ionisierender Gamma-Strahlung ein vermehrtes Auftreten eines Spaltprodukts von XIAP zu beobachten war. Da dieses XIAP-Fragment die BIR3-Domäne besitzt, welche durch eine direkte Bindung spezifisch die Inhibition der aktivierten Caspase-9 vermittelt (DEVERAUX et al., 1997, 1999), könnte es auch in der untersuchten Zelllinie für die fehlende Aktivierung der Caspase-9 verantwortlich sein. Im Gegensatz zu XIAP blieb die Expression von Survivin, einem weiteren anti-apoptotischen Mitglied der IAP-Familie, nach Exposition mit TRAIL und/oder Bestrahlung mit ionisierender Gamma-Strahlung in clearCa-22 unverändert, wohingegen eine verminderte Survivin-Expression nach analogen Behandlungen an Prostatakarzinomzellen gezeigt werden konnte (NIMMANAPALLI et al., 2001).

Insgesamt zeigen die vorliegenden Ergebnisse eine deutliche Heterogenität in der Sensitivität des humanen Nierenzellkarzinoms gegenüber einer TRAIL-vermittelten Apoptose. Darüber hinaus führte ionisierende Gamma-Strahlung nur in einer der untersuchten Zelllinien zu einer Sensibilisierung gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose. Des Weiteren deuten die vorliegenden Beobachtungen darauf hin, dass TRAIL- und Strahlungs-vermittelte Apoptose im Nierenzellkarzinom vorwiegend über den extrinsischen Caspase-8-vermittelten Signalweg der Apoptose verläuft, während der intrinsische Caspase-9-vermittelte Signalweg nicht genutzt wird. Die Fehlaktivierung des Caspase-9-Signalweges könnte zum einen auf einer beeinträchtigten Verbindung mit dem Caspase-8-Signalweg aufgrund fehlender Bid-Spaltung beruhen, zum anderen könnte sie auf ein beobachtetes XIAP-Spaltprodukt zurückzuführen sein, welches nachweislich spezifisch die Caspase-9-Aktivierung inhibiert. Daher könnte die Fehlaktivierung der Initiator-Caspase-9 zu der klinisch bekannten Strahlenresistenz des humanen Nierenzellkarzinoms beitragen und spricht somit gegen eine effektive Kombinationstherapie mit rhs-TRAIL und einer Bestrahlung mit ionisierender Gamma-Strahlung bei diesem Tumortyp.

6 Zusammenfassung

Die Apoptose ist ein streng reguliertes genetisches Selbstmordprogramm, das sowohl für die Embryonalentwicklung von Organismen als auch für die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase oder ein intaktes Immunsystem unverzichtbar ist. Es sorgt dafür, dass überflüssige, alte oder beschädigte Zellen kontrolliert absterben und eliminiert werden. Eine reduzierte Apoptosehäufigkeit begünstigt das Überleben und die Akkumulation entarteter Zellen und trägt dadurch maßgeblich zur Tumorentstehung bei. Daraus folgt, dass die Wiederherstellung der Apoptosebereitschaft in Tumorzellen unmittelbar zur gezielten Therapie von Tumoren genutzt werden könnte. Die meisten Tumore weisen jedoch eine Resistenz gegenüber einer Vielzahl apoptotischer Stimuli auf. Neben anderen zellulären Mechanismen ist diese Resistenz vor allem auf eine Fehlregulation der Apoptose zurückzuführen. Sowohl für die Aufklärung der Tumorpathogenese als auch im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapiekonzepte ist deshalb eine bessere Kenntnis der molekularen Apoptose-Mechanismen erforderlich. Speziell im humanen Nierenzellkarzinom, einem malignen Tumor, der sich ebenfalls durch eine weitgehende Apoptoseresistenz sowie eine ausgeprägte Chemo- und Strahlentherapieresistenz auszeichnet, sind diesbezüglich noch viele Fragen offen oder nur unvollständig beantwortet. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die im Nierenzellkarzinom vorliegenden Störungen der Apoptoseregulation unter den kontrollierten experimentellen Bedingungen eines *in-vitro*-Tumormodells zu analysieren. Hierbei wurden folgende **Fragen** aufgegriffen: 1.) das Expressionsmuster Apoptose-relevanter Gene in Zytostatika- und TRAIL-vermittelter Apoptose sowie die Bedeutung der differentiellen Genexpression für die Apoptoseresistenz des Nierenzellkarzinoms und 2.) die Möglichkeit, diese Apoptoseresistenz durch eine Kombinationsbehandlung von TRAIL und ionisierender Gamma-Strahlung zu überwinden.

Zur Untersuchung der **ersten Fragestellung** wurde die Wirkung des geno-toxischen Zytostatikums Topotecan und des rekombinanten humanen löslichen Todesliganden TRAIL, eines weitgehend tumorzellspezifischen Zytokins der TNF-Familie, auf humane Nierenkarzinomzelllinien analysiert. Lichtmikroskopische Analysen ließen dabei eine signifikante Heterogenität in der Sensitivität des Nierenzellkarzinoms, d.h. sowohl eine ausgeprägte Sensitivität als auch eine außerordentliche Resistenz, gegenüber einer Topotecan- oder TRAIL-induzierten Apoptose erkennen. Daraufhin wurden Expressionsänderungen 205 Apoptose-relevanter Gene mit Hilfe eines cDNA-Microarrays analysiert und das Ergebnis exemplarisch für einzelne Transkripte mittels Northern Blot verifiziert. Überraschenderweise zeigten die Ergebnisse nur sehr wenige Anhaltspunkte für eine Korrelation zwischen der heterogenen Apoptosesensitivität und dem Expressionsstatus der Apoptose-relevanten Gene. Die Mechanismen der Apoptoseresistenz der Tumorzelllinien waren hierbei zumindest teilweise der Geninduktion vorgeschaltet und schienen von einer *de novo* Synthese anti-apoptotischer Genprodukte oder einer Abnahme pro-apoptotischer Genprodukte weitgehend unabhängig zu sein. Der apoptotische Stimulus, ob nun extrinsisch oder intrinsisch, scheint somit mit einer zellulären Reaktionsumgebung konfrontiert zu sein, in der das apoptotische Signal entweder an die "Todesmaschinerie" der Tumorzelle weitergeleitet wird (apoptosesensitiv) oder ausbleibt (apoptoseresistent).

Wie bereits in vorangegangenen Untersuchungen beschrieben, stellt eine gestörte Aktivierung des extrinsischen TRAIL-Todesrezeptorsystems für die ausgeprägte Chemotherapieresistenz der Nierenzellkarzinome keine besondere Bedeutung dar. Vor diesem Hintergrund wurde die Kombinationswirkung von TRAIL und klinisch relevanten Dosen einer Bestrahlung mit ionisierender Gamma-Strahlung auf sechs humane Nierenkarzinomzelllinien als **zweite Fragestellung** der Arbeit untersucht. In einer der Tumorzelllinien konnte lichtmikroskopisch ein signifikanter Sensibilisierungseffekt beobachtet werden. Darüber hinaus konnten Western Blot Untersuchungen zeigen, dass sowohl die durch TRAIL als auch die durch Gamma-Strahlung induzierte Apoptose durch die proteolytische Prozessierung (Aktivierung) der Caspase-8 als Zeichen eines funktionell intakten TRAIL-Systems vermittelt wurde, wohingegen eine "Aktivierung" der Caspase-9 als Zeichen einer mitochondrialen Aktivierung der Apoptose nicht zu beobachten war. Dies lässt vermuten, dass humane Nierenzellkarzinome über eine Dysregulation im intrinsischen mitochondrialen Signalweg der apoptotischen Todesmaschinerie verfügen, die vor allem auf eine Beeinträchtigung der Caspase-9-Aktivierung zurückzuführen ist.

Zusammengefasst ergeben sich aus den Daten der vorliegenden Arbeit erste empirische Anhaltspunkte dafür, dass die Apoptoseresistenz am ehesten ein charakteristisches Merkmal des humanen Nierenzellkarzinoms ist. Die Mechanismen der Apoptoseresistenz des Nierenzellkarzinoms sind möglicherweise zumindest zum Teil auf der transkriptionalen Ebene lokalisiert und scheinen hierbei insbesondere auf eine Regulationsstörung der mitochondrialen Apoptose zurückzuführen zu sein: Dabei scheint der Caspase-9-Signalweg unmittelbar durch eine derartige Störung betroffen zu sein. Möglicherweise könnten deshalb zukünftig Substanzen, die die Caspase-9-Aktivierung wieder herstellen, auch für die Überwindung der breiten Apoptoseresistenz des Nierenzellkarzinoms nützlich werden.

7 Summary

Apoptosis is a strictly regulated cell suicide program essential for developing and maintaining adult tissue homeostasis or properly functioning immune system. This program ensures the controlled demolition and elimination of redundant, old or damaged cells. The decline of apoptosis frequency promotes survival and accumulation of neoplastic cells and contributes thereby significantly to the tumorigenesis. As a consequence, the restoration of the apoptosis in tumor cells could be used immediately for the targeted tumor therapy. However, most tumors exhibit a marked resistance to a variety of apoptotic stimuli. Beside other cellular mechanisms, this resistance is primarily due to a dysregulation of apoptosis. Therefore, a better knowledge of the molecular mechanisms of apoptosis is essential both for understanding the tumor pathogenesis and with regard to the development of new therapeutic concepts. Especially in human renal cell carcinoma (RCC), a malignant tumor which is characterized by extensive resistance to apoptosis as well as marked resistance to chemotherapy and radiotherapy, many questions in this context are still open or answered only incompletely. The aim of the present study was to analyze *in vitro* the disturbances of apoptosis regulation in RCC. The following **questions** were addressed: 1.) the expression pattern of apoptosis relevant genes in anticancer drug- and TRAIL-induced apoptosis as well as the impact of differential gene expression on apoptosis resistance in RCC, and 2.) the option to overcome apoptosis resistance by combination of TRAIL with ionising radiation (IR).

Concerning the **first question**, the effect of the anticancer drug Topotecan and the recombinant human soluble TRAIL, a member of the TNF family inducing apoptosis in cancer cells without affecting most non-neoplastic cells, to RCC cell lines was analyzed. The results demonstrated a marked heterogeneity in the sensitivity of the tumor cell lines to Topotecan- or TRAIL-induced apoptosis. Both distinct sensitivity and marked resistance were observed. Subsequently, expression changes of 205 apoptosis relevant genes were analyzed by cDNA microarray and verified exemplarily for single transcripts by northern blot. However, the results showed very little evidence of a correlation between heterogeneous apoptotic sensitivity and expression level of apoptosis relevant genes. The mechanisms of apoptosis resistance were, at least in part, located upstream of gene induction and seemed to be independent of upregulation of antiapoptotic genes or downregulation of proapoptotic genes. The proapoptotic stimulus – both extrinsic and intrinsic – seems to be confronted with a cellular context that allows apoptotic signal to be transduced to apoptotic death machinery (in the sensitive cell line) or not (in the resistant cell line).

Impaired activation of the TRAIL death receptor pathway is not of significant importance for resistance of RCC to chemotherapy. In view of this fact, the effect of a combination of TRAIL and IR to six RCC cell lines was analyzed in the **second part** of this study. In one of the tumor cell lines, a significant sensitization effect could be detected by light microscopy. In addition, western blot analyses have shown that TRAIL- and IR-induced apoptosis is predominantly mediated via the caspase-8 signal pathway indicating an intact TRAIL system, whereas the caspase-9 signal pathway is not utilized indicating a defective mitochondrial apoptosis pathway. Thus, it is most likely that RCC is characterized by a dysregulation of the intrinsic mitochondrial apoptosis pathway that is based primarily on a deficient activation of caspase-9.

In conclusion, the results from this study provide first empirical evidence that apoptosis resistance is most likely a characteristic feature of RCC. The Mechanisms of apoptosis resistance of this malignant tumor may be located, at least in part, on the transcriptional level and seem to be due to a dysregulation of mitochondrial apoptosis. The Caspase-9 signal pathway seems to be directly affected by such a dysregulation. Therefore, substances which restore the caspase-9 activation could possibly help in future also for overcoming the wide apoptosis resistance of renal cell carcinoma.

8 Perspektive

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bieten neue Kenntnisse dafür, dass humane Nierenzellkarzinome speziell auf der Ebene der mitochondrialen Apoptose als essentiellen Bestandteil des intrinsischen Apoptose-Signalweges über eine Blockade verfügen. Die molekularen Mechanismen für die gestörte Aktivierung der mitochondrialen Apoptose sind bislang jedoch nur wenig verstanden. Dabei könnte gerade eine genaue Kenntnis der zugrunde liegenden anti-apoptotischen Mechanismen dazu beitragen, neue Therapiekonzepte - z.B. im Sinne einer sogenannten zielgerichteten (targeted) Therapie mit Bcl-2-Inhibitoren (BH3-Mimetika) - zu entwickeln (CHONGHAILE et al., 2008; LEIBOWITZ et al., 2010). Hierbei könnte durch ein sogenanntes "BH3-Profilings" die Ansprechbarkeit der Tumorzellen gegenüber etablierten und neuen Therapien vorhergesagt werden. Solche zielgerichteten Therapien, die ihre Wirkung an den Mitochondrien entfalten, könnten so durch eine gezielte Reaktivierung der Mitochondrienvermittelten Apoptose eine wirkungsvolle Behandlung des malignen humanen Tumors ermöglichen.

8 Literaturverzeichnis

- Adida C., Recher C., Raffoux E., Daniel M.T., Taksin A.L., Rousselot P., Sigaux F., Degos L., Altieri D.C., & Dombret H. (2000) Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia. *Br.J.Haematol.* **111**, 196-203.
- Agami R., & Bernards R. (2000) Distinct initiation and maintenance mechanisms cooperate to induce G1 cell cycle arrest in response to DNA damage. *Cell* **102**, 55-66.
- Almasan A., & Ashkenazi A. (2003) Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**, 337-348.
- Amundson S.A., Myers T.G., & Fornace A.J. Jr. (1998) Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* **17**, 3287-3299.
- Antonsson B., Conti F., Ciavatta A., Montessuit S., Lewis S., Martinou I., Bernasconi L., Bernard A., Mermod J.J., Mazzei G., Maundrell K., Gambale F., Sadoul R., & Martinou J.C. (1997) Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* **277**, 370-372.
- Aravind L., Dixit V.M., & Koonin E.V. (1999) The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends Biochem.Sci.* **24**, 47-53.
- Arizono Y., Yoshikawa H., Naganuma H., Hamada Y., Nakajima Y., & Tasaka K. (2003) A mechanism of resistance to TRAIL/Apo2L-induced apoptosis of newly established glioma cell line and sensitisation to TRAIL by genotoxic agents. *Br.J.Cancer* **88**, 298-306.
- Arnt C.R., Chiorean M.V., Heldebrant M.P., Gores G.J., & Kaufmann S.H. (2002) Synthetic Smac/DIABLO peptides enhance the effects of chemotherapeutic agents by binding XIAP and cIAP1 in situ. *J.Biol.Chem.* **277**, 44236-44243.
- Ashkenazi A. (2002) Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat.Rev.Cancer* **2**, 420-430.
- Ashkenazi A., Pai R.C., Fong S., Leung S., Lawrence D.A., Marsters S.A., Blackie C., Chang L., McMurtrey A.E., Hebert A., DeForge L., Koumenis I.L., Lewis D., Harris L., Bussiere J., Koepfen H., Shahroksh Z., & Schwall R.H. (1999) Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J.Clin.Invest.* **104**, 155-162.
- Attardi L.D., Lowe S.W., Brugarolas J., & Jacks T. (1996) Transcriptional activation by p53, but not induction of the p21 gene, is essential for oncogene-mediated apoptosis. *EMBO J.* **15**, 3693-3701.
- Baker S.J. & Reddy E.P. (1996) Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* **12**, 1-9.
- Baldini N. (1997) Multidrug resistance – a multiplex phenomenon. *Nat.Med.* **3**, 378-380.
- Banner D.W., D'Arcy A., Janes W., Gentz R., Schoenfeld H.J., Broger C., Loetscher H., & Lesslauer W. (1993) Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* **73**, 431-445.
- Barak Y., Juven T., Haffner R., & Oren M. (1993) mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* **12**, 461-468.
- Barry M.A., Behnke C.A., & Eastman A. (1990) Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem.Pharmacol.* **40**, 2353-2362.
- Belka C., Schmid B., Marini P., Durand E., Rudner J., Faltin H., Bamberg M., Schulze-Osthoff K., & Budach W. (2001) Sensitization of resistant lymphoma cells to irradiation-induced apoptosis by the death ligand TRAIL. *Oncogene* **20**, 2190-2196.
- Belka C., Rudner J., Wesselborg S., Stepczynska A., Marini P., Lepple-Wienhues A., Faltin H., Bamberg M., Budach W., & Schulze-Osthoff K. (2000) Differential role of caspase-8 and BID activation during radiation- and CD95-induced apoptosis. *Oncogene* **19**, 1181-1190.
- Benedict C.A., & Ware C.F. (2012) TRAIL: not just for tumors anymore? *J.Exp.Med.* **209**:1903-1906.
- Bennett M., Macdonald K., Chan S.W., Luzio J.P., Simari R., & Weissberg P. (1998) Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* **282**, 290-293.
- Bergamaschi D., Samuels S., O'Neil N.J., Trigiant G., Crook T., Hsieh J.K., O'Connor D.J., Zhong S., Campargue I., Tomlinson M.L., Kuwabara P.E., & Lu X. (2003) iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human. *Nat.Genet.* **33**, 162-167.
- Birnbaum M.J., Clem R.J., & Miller L.K. (1994) An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J.Virol.* **68**, 2521-2528.
- Bodmer J.L., Holler N., Reynard S., Vinciguerra P., Schneider P., Juo P., Blenis J., & Tschopp J. (2000) TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat.Cell Biol.* **2**, 241-243.
- Boldin M.P., Varfolomeev E.E., Pancer Z., Mett I.L., Camonis J.H., & Wallach D. (1995b) A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J.Biol.Chem.* **270**, 7795-7798.
- Bouralexis S., Findlay D.M., Atkins G.J., Labrinidis A., Hay S., & Evdokiou A. (2003) Progressive resistance of BTK-143 osteosarcoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis is mediated by acquisition of DcR2/TRAIL-R4 expression: resensitisation with chemotherapy. *Br.J.Cancer* **89**, 206-214.

- Brakebusch C., Nophar Y., Kemper O., Engelmann H., & Wallach D. (1992) Cytoplasmic truncation of the p53 tumour necrosis factor (TNF) receptor abolishes signalling, but not induced shedding of the receptor. *EMBO J.* **11**, 943-950.
- Broker L.E., Kruyt F.A., & Giaccone G. (2005) Cell death independent of caspases: a review. *Clin. Cancer Res.* **11**, 3155-3162.
- Brown J.M., & Wouters B.G. (1999) Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res.* **59**, 1391-1399.
- Caelles C., Helmsberg A., & Karin M. (1994) p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* **370**, 220-223.
- Cam H., & Dynlacht B.D. (2003) Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication. *Cancer Cell* **3**, 311-316.
- Carson D.A., & Ribeiro J.M. (1993) Apoptosis and disease. *Lancet* **341**, 1251-1254.
- Chao D.T. & Korsmeyer S.J. (1998) BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu.Rev.Immunol.* **16**, 395-419.
- Chen A.Y., & Liu L.F. (1994a) Design of topoisomerase inhibitors to overcome MDR1-mediated drug resistance. *Adv.Pharmacol.* **29**, 245-256.
- Chen A.Y., & Liu L.F. (1994b) Mechanisms of resistance to topoisomerase inhibitors. *Cancer Treat.Res.* **73**, 263-81.
- Chen A.Y., Yu C., Potmesil M., Wall M.E., Wani M.C., & Liu L.F. (1991) Camptothecin overcomes MDR1-mediated resistance in human KB carcinoma cells. *Cancer Res.* **51**, 6039-6044.
- Chen C.Y., Oliner J.D., Zhan Q., Fornace A.J. Jr., Vogelstein B., & Kastan M.B. (1994) Interactions between p53 and MDM2 in a mammalian cell cycle checkpoint pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 2684-2688.
- Chinnaiyan A.M., Prasad U., Shankar S., Hamstra D.A., Shanaiah M., Chenevert T.L., Ross B.D., & Rehemtulla A. (2000) Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 1754-1759.
- Chinnaiyan A.M., O'Rourke K., Tewari M., & Dixit V.M. (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505-512.
- Chipuk J.E., Kuwana T., Bouchier-Hayes L., Droin N.M., Newmeyer D.D., Schuler M., & Green D.R. (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**, 1010-1014.
- Chirgwin J.M., Przybyla A.E., MacDonald R.J., & Rutter W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**, 5294-5299.
- Chomczynski P., & Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* **162**, 156-159.
- Chonghaile T.N., & Letai A. (2008) Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells. *Oncogene*. **27** Suppl 1: 149-157.
- Ciusani E., Croci D., Gelati M., Calatuzzolo C., Sciacca F., Fumagalli L., Balzarotti M., Fariselli L., Boiardi A., & Salmaggi A. (2005) In vitro effects of topotecan and ionizing radiation on TRAIL/Apo2L-mediated apoptosis in malignant glioma. *J.Neurooncol.* **71**, 19-25.
- Chittenden T., Harrington E.A., O'Connor R., Flemington C., Lutz R.J., Evan G.I., & Guild B.C. (1995) Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* **374**, 733-736.
- Chu W.M. (2013) Tumor necrosis factor. *Cancer Lett.* **328**, 222-225.
- Coelho D., Holl V., Weltin D., Lacomberie T., Magnenet P., Dufour P., & Bischoff P. (2000) Caspase-3-like activity determines the type of cell death following ionizing radiation in MOLT-4 human leukaemia cells. *Br.J.Cancer* **83**, 642-649.
- Cory S., Vaux D.L., Strasser A., Harris A.W., & Adams J.M. (1999) Insights from Bcl-2 and Myc: malignancy involves abrogation of apoptosis as well as sustained proliferation. *Cancer Res.* **59**, 1685-1692.
- Coutts A.S., & La Thangue N.B. (2005) The p53 response: emerging levels of co-factor complexity. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **331**, 778-785.
- Crook N.E., Clem R.J., & Miller L.K. (1993) An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J.Virol.* **67**, 2168-2174.
- Croxton R., Ma Y., Song L., Haura E.B., & Cress W.D. (2002) Direct repression of the Mcl-1 promoter by E2F1. *Oncogene* **21**, 1359-1369.
- Daniels R.A., Turley H., Kimberley F.C., Liu X.S., Mongkolsapaya J., Ch'En P., Xu X.N., Jin B.Q., Pezzella F., & Screaton G.R. (2005) Expression of TRAIL and TRAIL receptors in normal and malignant tissues. *Cell Res.* **15**, 430-438.
- Danks M.K., Pawlik C.A., Whipple D.O., & Wolverson J.S. (1997) Intermittent exposure of medulloblastoma cells to topotecan produces growth inhibition equivalent to continuous exposure. *Clin.Cancer Res.* **3**, 1731-1738.
- Davis R.J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**, 239-252.
- Debatin K.M., & Krammer P.H. (2004) Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* **23**, 2950-2966.
- Decker H.J., & Störkel S. (1998) Molekulargenetische Diagnostik und Histopathologie epithelialer Nierentumore. *Der Onkologe* **4**, 214-220.

- Degli-Esposti M.A., Dougall W.C., Smolak P.J., Waugh J.Y., Smith C.A., & Goodwin R.G. (1997) The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* **7**, 813-820.
- DeGregori J., Leone G., Miron A., Jakoi L., & Nevins J.R. (1997) Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 7245-7250.
- Dejosez M., Ramp U., Mahotka C., Krieg A., Walczak H., Gabbert H.E., & Gerharz C.D. (2000) Sensitivity to TRAIL/APO-2L-mediated apoptosis in human renal cell carcinomas and its enhancement by topotecan. *Cell Death Differ.* **7**, 1127-1136.
- Derijard B., Hibi M., Wu I.H., Barrett T., Su B., Deng T., Karin M., Davis R.J. (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**, 1025-1037.
- Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S., & Reed J.C. (1997) X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**, 300-304.
- Deveraux Q.L., Leo E., Stennicke H.R., Welsh K., Salvesen G.S., & Reed J.C. (1999) Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J.* **18**, 5242-5251.
- Di Pietro R., Secchiero P., Rana R., Gibellini D., Visani G., Bemis K., Zamai L., Miscia S., & Zauli G. (2001) Ionizing radiation sensitizes erythroleukemic cells but not normal erythroblasts to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated cytotoxicity by selective upregulation of TRAIL-R1. *Blood* **97**, 2596-2603.
- Dimova D.K., & Dyson N.J. (2005) The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* **24**, 2810-2826.
- Du C., Fang M., Li Y., Li L., & Wang X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42.
- Duckett C.S., Nava V.E., Gedrich R.W., Clem R.J., Van Dongen J.L., Gilfillan M.C., Shiels H., Hardwick J.M., & Thompson C.B. (1996) A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J.* **15**, 2685-2694.
- Dulic V., Kaufmann W.K., Wilson S.J., Tlsty T.D., Lees E., Harper J.W., Elledge S.J., & Reed S.I. (1994) p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* **76**, 1013-1023.
- Earnshaw W.C., Martins L.M., & Kaufmann S.H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu.Rev.Biochem.* **68**, 383-424.
- Duriez P.J., & Shah G.M. (1997) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. *Biochemistry and Cell Biology.* **75**; 337-349.
- Edinger A.L., & Thompson C.B. (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr.Opin.Cell Biol.* **16**, 663-669.
- Eggert A., Grotzer M.A., Zuzak T.J., Wiewrodt B.R., Ho R., Ikegaki N., & Brodeur G.M. (2001) Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Cancer Res.* **61**, 1314-1319.
- Eischen C.M., Packham G., Nip J., Fee B.E., Hiebert S.W., Zambetti G.P., & Cleveland J.L. (2001) Bcl-2 is an apoptotic target suppressed by both c-Myc and E2F-1. *Oncogene* **20**, 6983-6993.
- El-Deiry W.S. (1998) Regulation of p53 downstream genes. *Semin. Cancer Biol.* **8**, 345-357.
- Emery J.G., McDonnell P., Burke M.B., Deen K.C., Lyn S., Silverman C., Dul E., Appelbaum E.R., Eichman C., DiPrinzio R., Dodds R.A., James I.E., Rosenberg M., Lee J.C., & Young P.R. (1998) Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J.Biol.Chem.* **273**, 14363-14367.
- Evdokiou A., Bouralexis S., Atkins G.J., Chai F., Hay S., Clayer M., & Findlay D.M. (2002) Chemotherapeutic agents sensitize osteogenic sarcoma cells, but not normal human bone cells, to APO2L/TRAIL-induced apoptosis. *Int.J.Cancer* **99**, 491-504
- Falschlehner C., Emmerich C.H., Gerlach B., & Walczak H. (2007) TRAIL signalling: decisions between life and death. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **39**, 1462-1475.
- Fei P., & El-Deiry W.S. (2003) P53 and radiation responses. *Oncogene* **22**, 5774-5783.
- Fischer U., & Schulze-Osthoff K. (2005) New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacol.Rev.* **57**, 187-215.
- Fojo A.T., Shen D.W., Mickley L.A., Pastan I., & Gottesman M.M. (1987) Intrinsic drug resistance in human kidney cancer is associated with expression of a human multidrug-resistance gene. *J.Clin.Oncol.* **5**, 1922-1927.
- Frisch S.M., & Francis H. (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J.Cell Bio.* **124**, 619-626.
- Fulda S., & Debatin K.M. (2006) Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**, 4798-4811.
- Ganten T.M., Haas T.L., Sykora J., Stahl H., Sprick M.R., Fas S.C., Krueger A., Weigand M.A., Grosse-Wilde A., Stremmel W., Krammer P.H., & Walczak H. (2004) Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitisation of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs. *Cell Death Differ.* **11**, 86-96.
- Gerharz C.D., Ramp U., Dejosez M., Mahotka C., Czarnotta B., Bretschneider U., Lorenz I., Müller M., Krammer P.H., & Gabbert H.E. (1999) Resistance to CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis in human renal cell carcinomas: an important factor for evasion from negative growth control. *Lab.Invest.* **79**, 1521-1534.

- Gerharz C.D., Ramp U., Olert J., Moll R., Störkel S., Marx N., & Gabbert H.E. (1994) Cytomorphological, cytogenetic, and molecular biological characterization of four new human renal carcinoma cell lines of the clear cell type. *Virchows.Arch.* **424**, 403-409.
- Gerharz C.D., Moll R., Störkel S., Ramp U., Thoenes W., & Gabbert H.E. (1993) Ultrastructural appearance and cytoskeletal architecture of the clear, chromophilic, and chromophobe types of human renal cell carcinoma in vitro. *Am.J.Pathol.* **142**, 851-859.
- Gibson S.P., Oyer R., Spalding A.C., Anderson S.M., & Johnson G.L. (2000). Increased expression of death receptors 4 and 5 synergizes the apoptosis response to combined treatment with etoposide and TRAIL. *Mol.Cell Biol.* **20**, 205-212.
- Ginsberg D. (2002) E2F1 pathways to apoptosis. *FEBS Lett.* **529**, 122-125.
- Gong B., & Almasan A. (2000) Apo2 ligand/TNF-related apoptosis inducing ligand and death receptor 5 mediate the apoptotic signaling induced by ionizing radiation in leukemic cells. *Cancer Res.* **60**, 5754-5760.
- Goyal L., McCall K., Agapite J., Hartwig E., & Steller H. (2000) Induction of apoptosis by Drosophila reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. *EMBO J.* **19**, 589-597.
- Griffith T.S., & Kemp T.J. (2003) The topoisomerase I inhibitor topotecan increases the sensitivity of prostate tumor cells to TRAIL/Apo-2L-induced apoptosis. *Cancer Chemother.Pharmacol.* **52**, 175-184.
- Griffith T.S., Chin W.A., Jackson G.C., Lynch D.H., & Kubin M.Z. (1998) Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J.Immunol.* **161**, 2833-2840.
- Gross A., McDonnell J.M., & Korsmeyer S.J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **13**, 1899-1911.
- Gruss H.J. (1996) Molecular, structural, and biological characteristics of the tumor necrosis factor ligand superfamily. *Int.J.Clin.Lab.Res* **26**, 143-159.
- Güner D., Belka C., & Daniel P.T. (2003) Disruption of Cell Death Signaling in Cancer: Impact on Disease Prognosis and Response to Therapy. *Curr.Med.Chem.Anticancer Agents* **3**, 319-326.
- Guicciardi M.E., & Gores G.J. (2009) Life and death by death receptors. *FASEB J.* **23**, 1625-1637.
- Halestrap A.P., McStay G.P., & Clarke S.J. (2002) The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* **84**, 153-166.
- Hartmann J.T., & Bokemeyer C. (1999) Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* **19**, 1541-1543.
- Heath C.W., Jr., Lally C.A., Calle E.E., McLaughlin J.K., & Thun M.J. (1997) Hypertension, diuretics, and antihypertensive medications as possible risk factors for renal cell cancer. *Am.J.Epidemiol.* **145**, 607-613.
- Haitel A., Wiener H.G., Baethge U., Marberger M., & Susani M. (2000) mdm2 expression as a prognostic indicator in clear cell renal cell carcinoma: comparison with p53 overexpression and clinicopathological parameters. *Clin.Cancer Res.* **6**: 1840-184.
- Heikaus S., Casliskan E., Mahotka, C., Gabbert H.E., & Ramp U. (2007) Differential gene expression in anticancer drug- and TRAIL-mediated apoptosis in renal cell carcinomas. *Apoptosis* **12**, 1645-1657.
- Helin K., Harlow E., & Fattaey A. (1993) Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol.Cell Biol.* **13**, 6501-6508
- Hendricks C.B., Rowinsky E.K., Grochow L.B., Donehower R.C., & Kaufmann S.H. (1992) Effect of P-glycoprotein expression on the accumulation and cytotoxicity of topotecan (SK&F 104864), a new camptothecin analogue. *Cancer Res.* **52**, 2268-2278.
- Hengartner M.O., & Horvitz H.R. (1994) Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **4**, 581-586.
- Hetts S.W. (1998) To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* **279**, 300-307.
- Hitchens M.R., & Robbins P.D. (2003) The role of the transcription factor DP in apoptosis. *Apoptosis* **8**, 461-468.
- Hickman J.A. (1992) Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev.* **11**, 121-139.
- Hingorani S.R., & Tuveson D.A. (2003) Ras redux: rethinking how and where Ras acts. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **13**, 6-13.
- Hollander M.C., Alamo I., Jackman J., Wang M.G., McBride O.W., & Fornace A.J. Jr. (1993) Analysis of the mammalian gadd45 gene and its response to DNA damage. *J.Biol.Chem.* **268**, 24385-24393.
- Horn H.F., & Vousden K.H. (2007) Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene* **26**, 1306-1316.
- Hotta T., Suzuki H., Nagai S., Yamamoto K., Imakiire A., Takada E., Itoh M., & Mizuguchi J. (2003) Chemotherapeutic agents sensitize sarcoma cell lines to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced caspase-8 activation, apoptosis and loss of mitochondrial membrane potential. *J.Orthop.Res.* **21**, 949-957.
- Hsiang Y.H., Liu L.F., Wall M.E., Wani M.C., Nicholas A.W., Manikumar G., Kirschenbaum S., Silber R., & Potmesil M. (1989) DNA topoisomerase I-mediated DNA cleavage and cytotoxicity of camptothecin analogues. *Cancer Res.* **49**, 4385-4389. Erratum in: *Cancer Res.* **49**, 6868.
- Hsiang Y.H., Hertzberg R., Hecht S., & Liu L.F. (1985) Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian topoisomerase I. *J.Biol.Chem.* **260**, 14873-14878.
- Huang Y., Rich R.L., Myszka D.G., & Wu H. (2003) Requirement of both the second and third BIR domains for the relief of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)-mediated caspase inhibition by Smac. *J.Biol.Chem.* **278**, 49517-49522.

- Humerickhouse R., Lohrbach K., Li L., Bosron W.F., & Dolan M.E. (2000) Characterization of CPT-11 hydrolysis by human liver carboxylesterase isoforms hCE-1 and hCE-2. *Cancer Res.* **60**, 1189-1192.
- Hymowitz S.G., O'Connell M.P., Ultsch M.H., Hurst A., Totpal K., Ashkenazi A., de Vos A.M., & Kelley R.F. (2000) A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry* **39**, 633-640.
- Hymowitz S.G., Christinger H.W., Fuh G., Ultsch M., O'Connell M., Kelley R.F., Ashkenazi A., & de Vos A.M. (1999) Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol.Cell.* **4**, 563-571.
- Igney F.H., & Krammer P.H. (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat.Rev.Cancer* **4**, 277-288.
- Iliakis G., Wang Y., Guan J., & Wang H. (2003) DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* **22**, 5834-5847.
- Imler M., Thome M., Hahne M., Schneider P., Hofmann K., Steiner V., Bodmer J.L., Schröter M., Burns K., Mattmann C., Rimoldi D., French L.E., & Tschopp J. (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**, 190-195.
- Irwin M., Marin M.C., Phillips A.C., Seelan R.S., Smith D.I., Liu W., Flores E.R., Tsai K.Y., Jacks T., Vousden K.H., & Kaelin W.G. Jr. (2000) Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* **407**, 645-648.
- Irwin M.S., & Kaelin W.G. (2001) p53 family update: p73 and p63 develop their own identities. *Cell Growth Differ.* **12**, 337-349.
- Jacobson M.D., Weil M., & Raff M.C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347-354.
- Jazirehi A.R., Ng C.P., Gan X.H., Schiller G., & Bonavida B. (2001) Adriamycin sensitizes the adriamycin-resistant 8226/Dox40 human multiple myeloma cells to Apo2L/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated (TRAIL) apoptosis. *Clin.Cancer Res.* **7**, 3874-83.
- Jenner T.J., Fulford J., & O'Neill P. (2001) Contribution of base lesions to radiation-induced clustered DNA damage: implication for models of radiation response. *Radiat.Res.* **156**, 590-593.
- Jenner T.J., Cuniffe S.M., Stevens D.L., & O'Neill P. (1998) Induction of DNA-protein crosslinks in Chinese hamster V79-4 cells exposed to high- and low-linear energy transfer radiation. *Radiat.Res.* **150**, 593-599.
- Johnson M., Dimitrov D., Vojta P.J., Barrett J.C., Noda A., Pereira-Smith O.M., & Smith J.R. (1994) Evidence for a p53-independent pathway for upregulation of SDI1/CIP1/WAF1/p21 RNA in human cells. *Mol.Carcinog.* **11**, 59-64.
- Johnson D.G., & Degregori J. (2006) Putting the oncogenic and tumor suppressive activities of E2F into context. *Curr.Mol.Med.* **6**, 731-738.
- Johnston J.B., Kabore A.F., Strutinsky J., Hu X., Paul J.T., Kropp D.M., Kuschak B., Begleiter A., & Gibson S.B. (2003) Role of the TRAIL/APO2-L death receptors in chlorambucil- and fludarabine-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Oncogene* **22**, 8356-8369.
- Joseph B., Marchetti P., Formstecher P., Kroemer G., Lewensohn R., & Zhivotovsky B. (2002) Mitochondrial dysfunction is an essential step for killing of non-small cell lung carcinomas resistant to conventional treatment. *Oncogene* **21**, 65-77.
- Joseph B., Ekedahl J., Lewensohn R., Marchetti P., Formstecher P., & Zhivotovsky B. (2001) Defective caspase-3 relocalization in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene* **20**, 2877-2888.
- Kastan M.B., Onyekwere O., Sidransky D., Vogelstein B., & Craig R.W. (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* **51**, 6304-6311.
- Kayagaki N., Yamaguchi N., Nakayama M., Takeda K., Akiba H., Tsutsui H., Okamura H., Nakanishi K., Okumura K., & Yagita H. (1999) Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J.Immunol.* **163**, 1906-1913.
- Kayagaki N., Kawasaki A., Ebata T., Ohmoto H., Ikeda S., Inoue S., Yoshino K., Okumura K., & Yagita H. (1995) Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J.Exp.Med.* **182**, 1777-1783.
- Kelly M.M., Hoel B.D., & Voelkel-Johnson C. (2002) Doxorubicin pretreatment sensitizes prostate cancer cell lines to TRAIL induced apoptosis which correlates with the loss of c-FLIP expression *Cancer Biol. Ther.* **1**, 520-527.
- Kerr J.F., Wyllie A.H., & Currie A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* **26**, 239-257.
- Khanna R., Morton C.L., Danks M.K., & Potter P.M. (2000) Proficient metabolism of irinotecan by a human intestinal carboxylesterase. *Cancer Res.* **60**, 4725-4728.
- Kim M.R., Lee J.Y., Park M.T., Chun Y.J., Jang Y.J., Kang C.M., Kim H.S., Cho C.K., Lee Y.S., Jeong H.Y., & Lee S.J. (2001a) Ionizing radiation can overcome resistance to TRAIL in TRAIL-resistant cancer cells. *FEBS Lett.* **501**, 179-184.
- Kim K., Takimoto R., Dicker D.T., Chen Y., Gazitt Y., & El-Deiry W.S. (2001b) Enhanced TRAIL sensitivity by p53 overexpression in human cancer but not normal cell lines. *Int.J.Oncol.* **18**, 241-247.
- Kimberly F.C., & Screaton G.R. (2004) Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res.* **14**, 359-372.
- Kischkel F.C., Lawrence D.A., Chuntharapai A., Schow P., Kim K.J., & Ashkenazi A. (2000) Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* **12**, 611-620.

- Kollmannsberger C., Mross K., Jakob A., Kanz L., & Bokemeyer C. (1999) Topotecan - A novel topoisomerase I inhibitor: pharmacology and clinical experience. *Oncology* **56**, 1-12.
- Koschny R., Walczak H., & Ganten T.M. (2007) The promise of TRAIL – potential and risks of a novel anticancer therapy. *J.Mol.Med.* **85**, 923-935.
- Kovacs G., Fuzesi L., Emanuel A., & Kung H.F. (1991) Cytogenetics of papillary renal cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer* **3**, 249-255.
- Kowalik T.F., DeGregori J., Leone G., Jakoi L., & Nevins J.R. (1998) E2F1-specific induction of apoptosis and p53 accumulation, which is blocked by Mdm2. *Cell Growth Differ.* **9**, 113-118.
- Kowalik T.F., DeGregori J., Schwarz J.K., & Nevins J.R. (1995) E2F1 overexpression in quiescent fibroblasts leads to induction of cellular DNA synthesis and apoptosis. *J.Virol.* **69**, 2491-2500.
- Krajewski S., Tanaka S., Takayama S., Schibler M.J., Fenton W., & Reed J.C. (1993) Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* **53**, 4701-4714.
- Kratzmeier M., Albig W., Hanecke K., & Doenecke D. (2000) Rapid dephosphorylation of H1 histones after apoptosis induction. *J.Biol.Chem.* **275**, 30478-30486.
- Krieg A., Schulte am Esch J. 2nd, Ramp U., Hosch S.B., Knoefel W.T., Gabbert H.E., & Mahotka C. (2006) TRAIL-R4-beta: a new splice variant of TRAIL-receptor 4 lacking the cysteine rich domain 1. *Biochem.Biophys. Res. Commun.* **349**, 115-121.
- Krieg A., Krieg T., Wenzel M., Schmitt M., Ramp U., Fang B., Gabbert H.E., Gerharz C.D., & Mahotka C. (2003) TRAIL- β and TRAIL- γ : two novel splice variants of the human TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) without apoptotic potential. *Br. J. Cancer* **88**, 918-27.
- Kroemer G. (1998) The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. *Cell Death Differ.* **5**, 547.
- Kuerbitz S.J., Plunkett B.S., Walsh W.V., & Kastan M.B. (1992) Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**, 7491-7495.
- Lacour S., Micheau O., Hammann A., Drouineaud V., Tschopp J., Solary E., & Dimanche-Boitrel M.T. (2003) Chemotherapy enhances TNF-related apoptosis-inducing ligand DISC assembly in HT29 human colon cancer cells. *Oncogene* **22**, 1807-1826.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lane D.P. (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15-16.
- LeBlanc H.N., & Ashkenazi A. (2003) Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ.* **10**, 66-75.
- Lee M.W., Park S.C., Yang Y.G. Yim S.O., Chae H.S., Bach J.H., Lee H.J., Kim K.Y., Lee W.B., & Kim S.S. (2002) The involvement of reactive oxygen species (ROS) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase in TRAIL/Apo2L-induced apoptosis. *FEBS Lett.* **512**, 313-318.
- Leibowitz B., & Yu J. (2010) Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family. *Cancer Biol. Ther.* **9**, 417-422.
- Legarza K., & Yang L.X. (2006) New molecular mechanisms of action of camptothecin-type drugs. *Anticancer Res.* **26**, 3301-3305.
- Leu J.I., Dumont P., Hafey M., Murphy M.E., & George D.L. (2004) Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat.Cell Biol.* **6**, 443-450.
- Levine A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**, 323-331.
- Levkau B., Garton K.J., Ferri N., Kloke K., Nofer J.R., Baba H.A., Raines E.W., & Breithardt G. (2001) xIAP induces cell-cycle arrest and activates nuclear factor-kappaB : new survival pathways disabled by caspase-mediated cleavage during apoptosis of human endothelial cells. *Circ.Res.* **88**, 282-290.
- Levrero M., De Laurenzi V., Costanzo A., Gong J., Wang J.Y., & Melino G. (2000) The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J.Cell Sci.* **113**, 1661-1670.
- Li F., Ackermann E.J., Bennett C.F., Rothermel A.L., Plescia J., Tognin S., Villa A., Marchisio P.C., & Altieri D.C. (1999) Pleiotropic cell division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat.Cell Biol.* **1**, 461-466.
- Li H., Zhu H., Xu C.J., & Yuan J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501.
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S., & Wang X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-489.
- Lin W.C., Lin F.T., & Nevins J.R. (2001) Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev.* **15**, 1833-1844.
- Lindstrom M.S., & Wiman K.G. (2003) Myc and E2F1 induce p53 through p14ARF-independent mechanisms in human fibroblasts. *Oncogene* **22**, 4993-5005.
- Liu L.F. (1989) DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu.Rev.Biochem.* **58**, 351-375.

- Liu W., Bodle E., Chen J.Y., Gao M., Rosen G.D., & Broaddus V.C. (2001) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and chemotherapy cooperate to induce apoptosis in mesothelioma cell lines. *Am.J.Resp.Cell Mol.Biol.* **25**, 111-118.
- Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemerson R., & Wang X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**, 147-157.
- Liu Z., Sun C., Olejniczak E.T., Meadows R.P., Betz S.F., Oost T., Herrmann J., Wu J.C., & Fesik S.W. (2000) Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature* **408**, 1004-1008.
- Lottspeich F. & Zorbas H. (1998) Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin.
- Lotem J., & Sachs L. (1993) Regulation by bcl-2, c-myc, and p53 of susceptibility to induction of apoptosis by heat shock and cancer chemotherapy compounds in differentiation-competent and -defective myeloid leukemic cells. *Cell Growth Differ.* **4**, 41-47.
- Lowe S.W., & Lin A.W. (2000) Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* **21**, 485-495.
- Lowe S.W., Ruley H.E., Jacks T., & Housman D.E. (1993) p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer drugs. *Cell* **74**, 957-967.
- Luthi A.U., & Martin S.J. (2007) The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ.* **14**, 641-650.
- Ly J.D., Grubb D.R., & Lawen A. (2003) The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis*. **8**, 115-128.
- Maeda T., Hanna A.N., Sim A.B., Chua P.P., Chong M.T., & Tron V.A. (2002) GADD45 regulates G2/M arrest, DNA repair, and cell death in keratinocytes following ultraviolet exposure. *J.Invest.Dermatol.* **119**, 22-26.
- Mahotka C., Liebmann J., Wenzel M., Suschek C.V., Schmitt M., Gabbert H.E., & Gerharz CD. (2002) Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. *Cell Death Differ.* **9**, 1334-1342.
- Mariani S.M., & Krammer P.H. (1998) Surface expression of TRAIL/Apo-2 ligand in activated mouse T and B cells. *Eur.J.Immunol.* **28**, 1492-1498.
- Marine, J. C., Francoz S., Maetens M., Wahl G., Toledo F., & Lozano G. (2006) Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. *Cell Death.Differ.* **13**, 927-934.
- Marsters S.A., Sheridan J.P., Pitti R.M., Huang A., Skubatch M., Baldwin D., Yuan J., Gurney A., Goddard A.D., Godowski P., and Ashkenazi A. (1997) A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr.Biol.* **7**, 1003-1006.
- Martelli F., Hamilton T., Silver D.P., Sharpless N.E., Bardeesy N., Rokas M., DePinho R.A., Livingston D.M., & Grossman S.R. (2001) p19ARF targets certain E2F species for degradation. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* **98**, 4455-4460.
- McFarlane M., Ahmad M., Srinivasula S.M., Fernandes-Alnemri T., Cohen G.M., & Alnemri E.S. (1997) Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J.Biol.Chem.* **272**, 25417-25420.
- McGeehan G.M., Becherer J.D., Bast R.C. Jr., Boyer C.M., Champion B., Connolly K.M., Conway J.G., Furdon P., Karp S., Kidao S. et al. (1994) Regulation of tumour necrosis factor-alpha processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature* **370**, 558-561.
- Mellier G., Huang S., Shenoy K., & Pervaiz S. (2010) TRAILing death in cancer. *Mol.Aspects Med.* **31**, 93-112.
- Meng R.D., Phillips P., & El-Deiry W.S. (1999) p53-independent increase in E2F-1 expression enhances the cytotoxic effects of etoposide and of adriamycin. *Int.J.Oncol.* **14**, 5-14.
- Meylan E., & Tschopp J. (2005) The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends Biochem.Sci.* **30**, 151-159.
- Miao L., Yi P., Wang Y., & Wu M. (2003) Etoposide upregulates bax-enhancing tumour necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-mediated apoptosis in the human hepatocellular carcinoma cell line QGY-7703. *Eur.J.Biochem.* **270**, 2721-2731.
- Mihara M., Erster S., Zaika A., Petrenko O., Chittenden T., Pancoska P., & Moll U.M. (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol.Cell* **11**, 577-590.
- Miller L.K. (1999) An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol.* **9**, 323-328.
- Milner J. (1995) DNA damage, p53 and anticancer therapies. *Nat.Med.* **1**, 879-880.
- Minn A.J., Velez P., Schendel S.L., Liang H., Muchmore S.W., Fesik S.W., Fill M., & Thompson C.B. (1997) Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* **385**, 353-357.
- Mitsiades N., Poulaki V., Mitsiades C., & Tsokos M. (2001) Ewing's sarcoma family tumors are sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and express death receptor 4 and death receptor 5. *Cancer Res.* **61**, 2704-2712.
- Miyashita T., & Reed J.C. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**, 293-299.
- Mizutani Y., Nakanishi H., Yoshida O., Fukushima M., Bonavida B., & Miki T. (2002) Potentiation of the sensitivity of renal cell carcinoma cells to TRAIL-mediated apoptosis by subtoxic concentrations of 5-fluorouracil. *Eur.J.Cancer* **38**, 167-176.
- Mizutani Y., Nakao M., Ogawa O., Yoshida O., Bonavida B., & Miki T. (2001) Enhanced sensitivity of bladder cancer cells to tumor necrosis factor related inducing ligand mediated apoptosis by cisplatin and carboplatin. *J.Urol.* **165**, 263-270.
- Morgan M., Williams B.A., Blay J., & Hoskin D.W. (2002) Chemosensitization of T-47D breast carcinoma cells to TRAIL and Fas receptor-induced killing. *Anticancer Res.* **22**, 673-676.

- Moroni M.C., Hickman E.S., Lazzerini Denchi E., Caprara G., Colli E., Cecconi F., Müller H., & Helin K. (2001) Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat. Cell Biol.* **3**, 552-558.
- Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol.Methods* **65**, 55-63.
- Motzer R.J., Russo P., Nanus D.M., & Berg W.J. (1997) Renal cell carcinoma. *Curr.Probl.Cancer* **21**, 185-232.
- Muchmore S.W., Sattler M., Liang H., Meadows R.P., Harlan J.E., Yoon H.S., Nettesheim D., Chang B.S., Thompson C.B., Wong S.L., Ng S.L., & Fesik S.W. (1996) X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* **381**, 335-341.
- Müller M., Wilder S., Bannasch D., Israeli D., Lehlbach K., Li-Weber M., Friedman S.L., Galle P.R., Stremmel W., Oren M., & Krammer P.H. (1998) p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J.Exp.Med.* **188**, 2033-2045.
- Mulders P., Figlin R., deKernion J.B., Wiltrott R., Linehan M., Parkinson D., deWolf W., & Beldegrun A. (1997) Renal cell carcinoma: recent progress and future directions. *Cancer Res.* **57**, 5189-5195.
- Nachmias B., Ashhab Y., & Ben-Yehuda D. (2004) The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Semin.Cancer Biol.* **14**, 231-243.
- Nagane M., Huang H-J S., & Cavenee W.K. (2001) The potential of TRAIL for cancer chemotherapy. *Apoptosis* **6**, 191-197.
- Nagane M., Pan G., Weddle J.J., Dixit V.M., Cavenee W.K., & Su Huang H.J. (2000) Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **60**, 847-853.
- Nagata S. (2000) Steering anti-cancer drugs away from the TRAIL. *Nat.Med.* **6**, 502-503.
- Nahle Z., Polakoff J., Davuluri R.V., McCurrach M.E., Jacobson MD, Narita M, Zhang MQ, Lazebnik Y, Bar-Sagi D., & Lowe S.W. (2002) Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat.Cell Biol.* **4**, 859-864.
- Naka T., Sugamura K., Hylander B.L., Widmer M.B., Rustum Y.M., & Repasky E.A. (2002) Effects of Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Alone and in Combination with Chemotherapeutic Agents on Patients' Colon Tumors Grown in SCID Mice. *Cancer Res.* **62**, 5800-5806.
- Neumann H.P., Bender B.U., Berger D.P., Laubenberger J., Schultze-Seemann W., Wetterauer U., Ferstl F.J., Herbst E.W., Schwarzkopf G., Hes F.J., Lips C.J., Lamiell J.M., Masek O., Riegler P., Mueller B., Glavac D., & Brauch H. (1998) Prevalence, morphology and biology of renal cell carcinoma in von Hippel-Lindau disease compared to sporadic renal cell carcinoma. *J.Urol.* **160**, 1248-1254.
- Newman H.C., Prise K.M. & Michael B.D. (2000) The role of higher-order chromatin structure in the yield and distribution of DNA double-strand breaks in cells irradiated with X-rays or alphaparticles. *Int. J.Radiat.Biol.* **76**, 1085-1093.
- Newton K., & Strasser A. (2000) Ionizing radiation and chemotherapeutic drugs induce apoptosis in lymphocytes in the absence of Fas or FADD/MORT1 signaling: implications for cancer therapy. *J.Exp.Med.* **191**, 195-200.
- Nimmanapalli R., Perkins C.L., Orlando M., O'Bryan E., Nguyen D., & Bhalla K.N. (2001) Pretreatment with paclitaxel enhances Apo-2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of prostate cancer cells by inducing death receptors 4 and 5 protein levels. *Cancer Res.* **61**, 759-763.
- Norbury C.J., & Zhivotovsky B. (2004) DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* **23**, 2797-2808.
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**, 1053-1058.
- Ogasawara J., Watanabe-Fukunaga R., Adachi M., Matsuzawa A., Kasugai T., Kitamura Y., Itoh N., Suda T., & Nagata S. (1993) Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* **364**, 806-809.
- Ohtsuka T., Buchsbaum D., Oliver P., Makhija S., Kimberly R., & Zhou T. (2003) Synergistic induction of tumor cell apoptosis by death receptor antibody and chemotherapy agent through JNK/p38 and mitochondrial death pathway. *Oncogene* **22**, 2034-2044.
- Oltvai Z.N., Millman C.L., & Korsmeyer S.J. (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* **74**, 609-619.
- Orrenius S. (2004) Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol.Lett.* **149**, 19-23.
- Owen-Schaub L.B., Zhang W., Cusack J.C., Angelo L.S., Santee S.M., Fujiwara T., Roth J.A., Deisseroth A.B., Zhang W.W., Kruzal E., et al. (1995) Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol.Cell Biol.* **15**, 3032-3040.
- Oya M., Ohtsubo M., Takayanagi A., Tachibana M., Shimizu N., & Murai M. (2001) Constitutive activation of nuclear factor-kappaB prevents TRAIL-induced apoptosis in renal cancer cells. *Oncogene* **20**, 3888-3896.
- Pan G., Ni J., Yu G., Wei Y.F., & Dixit V.M. (1998) TRUND, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling. *FEBS Lett.* **424**, 41-45.
- Pan G., O'Rourke K., Chinnaiyan A.M., Gentz R., Ebner R., Ni J., & Dixit V.M. (1997) The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* **276**, 111-113

- Pan G., Ni J., Wei Y.F., Yu G., Gentz R., & Dixit V.M. (1997b) An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* **277**, 815-818.
- Pawlowski J.E., Nesterov A., Scheinman R.I., Johnson T.R., & Kraft A.S. (2000) NF-kappa B does not modulate sensitivity of renal carcinoma cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Anticancer Res.* **20**, 4243-4256.
- Pediconi N., Ianari A., Costanzo A., Belloni L., Gallo R., Cimino L., Porcellini A., Screpanti I., Balsano C., Alesse E., Gulino A., & Leviero M. (2003) Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.* **5**, 552-558.
- Petit P.X., Lecoeur H., Zorn E., Dauguet C., Mignotte B., & Gougeon M.L. (1995) Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J. Cell Biol.* **130**, 157-167.
- Phillips A.C., Ernst M.K., Bates S., Rice N.R., & Vousden K.H. (1999) E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways *Mol. Cell* **4**, 771-781.
- Pitti R.M., Marsters S.A., Ruppert S., Donahue C.J., Moore A., & Ashkenazi A. (1996) Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J. Biol. Chem.* **271**, 12687-12690.
- Polager S., & Ginsberg D. (2009) p53 and E2f: partners in life and death. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 738-48.
- Polager S., & Ginsberg D. (2008) E2F – at the crossroads of life and death. *Trends Cell Biol.* **18**, 528-535.
- Pruschy M., Wirbelauer C., Glanzmann C., Bodis S., & Krek W. (1999) E2F-1 has properties of a radiosensitizer and its regulation by cyclin A kinase is required for cell survival of fibrosarcoma cells lacking p53. *Cell Growth Differ.* **10**, 141-146.
- Qin X.Q., Livingston D.M., Kaelin W.G. Jr, & Adams P.D. (1994) Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **91**, 10918-10922.
- Raff M.C. (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature* **356**; 397-400.
- Ramp U., Krieg T., Caliskan E., Mahotka C., Ebert T., Gabbert HE., & Gerharz CD. (2004) XIAP expression is an independent prognostic marker in clear-cell renal carcinoma. *Hum Pathol.* **35**, 1022-1028.
- Ramp U., Caliskan E., Mahotka C., Krieg A., Heikaus S., Gabbert HE., & Gerharz CD. (2003) Apoptosis induction in renal cell carcinoma by TRAIL and gamma-radiation is impaired by deficient caspase-9 cleavage. *Br. J. Cancer* **88**, 1800-1807.
- Ramp U., Caliskan E., Ebert, T., Karagiannidis R., Willers R., Gabbert HE., & Gerharz CD. (2002) FHIT expression in clear cell renal carcinomas: versatility of protein levels and correlation with survival. *J. Pathol.* **196**, 430-436.
- Ramp U., Mahotka C., Kalinski T., Ebel E., Gabbert H.E., & Gerharz C.D. (2001) Topotecan (Hycamtin) responsiveness in human renal carcinoma cell lines of the clear cell and papillary types. *Anticancer Res.* **21**, 3509-3517.
- Ramp U., Dejosez M., Mahotka C., Czarnotta B., Kalinski T., Wenzel M., Lorenz I., Muller M., Krammer P., Gabbert H.E., & Gerharz C.D. (2000) Deficient activation of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis: a potential factor of multidrug resistance in human renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer* **82**, 1851-1859.
- Ravi R., Bedi G.C., Engstrom L.W., Zeng Q., Mookerjee B., Gelinis C., Fuchs E.J., & Bedi A. (2001) Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB. *Nat. Cell Biol.* **3**, 409-416.
- Ray S., & Almasan A. (2003) Apoptosis induction in prostate cancer cells and xenografts by combined treatment with Apo2ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and CPT-11. *Cancer Res.* **63**, 4713-23.
- Reed J.C. (1999) Dysregulation of apoptosis in cancer. *J. Clin. Oncol.* **17**, 2941-2953.
- Riedl S.J., & Shi Y. (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 897-907.
- Riedl S.J., Fuentes-Prior P., Renucci M., Kairies N., Krapp S., Huber R., Salvesen G.S., & Bode W. (2001) Structural basis for the activation of human procaspase-7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98**, 14790-14795.
- Roa W.H., Chen H., Fulton D., Gulavita S., Shaw A., Th'ng J., Farr-Jones M., Moore R., & Petruk K. (2003) X-linked inhibitor regulating TRAIL-induced apoptosis in chemoresistant human primary glioblastoma cells. *Clin. Invest. Med.* **26**, 231-242.
- Robertson K.D., & Jones P.A. (1998) The human ARF cell cycle regulatory gene promoter is a CpG island which can be silenced by DNA methylation and down-regulated by wild-type p53. *Mol. Cell Biol.* **18**, 6457-6473.
- Röhn T.A., Wagenknecht B., Roth W., Naumann U., Gulbins E., Krammer P.H., Walczak H., & Weller M. (2001) CCNU-dependent potentiation of TRAIL/Apo2L-induced apoptosis in human glioma cells is p53-independent but may involve enhanced cytochrome c release. *Oncogene* **20**, 4128-4137.
- Roth W., & Reed J.C. (2004) FLIP protein and TRAIL-induced apoptosis. *Vitam. Horm.* **67**, 189-206.
- Rotonda J., Nicholson D.W., Fazil K.M., Gallant M., Gareau Y., Labelle M., Peterson E.P., Rasper D.M., Ruel R., Vaillancourt J.P., Thornberry N.A., & Becker J.W. (1996) The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 619-625.
- Roy R., Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S., & Reed J.C. (1997) The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* **16**, 6914-25.

- Rudner J., Lepple-Wienhues A., Budach W., Berschauer J., Friedrich B., Wesselborg S., Schulze-Osthoff K., & Belka C. (2001) Wild-type, mitochondrial and ER-restricted Bcl-2 inhibit DNA damage-induced apoptosis but do not affect death receptor-induced apoptosis. *J. Cell Sci.* **114**, 4161-4172.
- Russell J.L., Powers J.T., Rounbehler R.J., Rogers P.M., Conti C.J., & Johnson D.G. (2002) ARF differentially modulates apoptosis induced by E2F1 and Myc. *Mol. Cell Biol.* **22**, 1360-1368.
- Salvesen G.S., & Dixit V.M. (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 10964-10967.
- Sambrook J., Fritsch E.F., & Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition, Cold Spring Harbor, New York.
- Samuels-Lev Y., Connor D.O., Bergamaschi D., Trigiante G., Hsieh J., Zhong S., Campargue I., Naumovski L., Crook T., & Lu X. (2001) ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol. Cell.* **8**, 781-94.
- Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K.J., Debatin K.M., Krammer P.H., & Peter M.E. (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* **17**; 1675-1687.
- Schaefer U., Voloshanenko O., Willen D., & Walczak H. (2007) TRAIL: a multifunctional cytokine. *Front. Biosci.* **12**, 3813-3824.
- Schaefer-Prokop C.M. (1998) Bildgebende Diagnostik des Nierenzellkarzinoms. *Der Onkologe* **4**, 221-228.
- Schendel S.L., Xie Z., Montal M.O., Matsuyama S., Montal M., & Reed J.C. (1997) Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 5113-5118.
- Schendel S.L., Azimov R., Pawlowski K., Godzik A., Kagan B.L., & Reed J.C. (1999) Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID. *J. Biol. Chem.* **274**, 21932-21936.
- Schendel S.L., Montal M., & Reed J.C. (1998) Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ.* **5**, 372-380.
- Schimmer A.D. (2004) Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res* **64**, 7183-7190.
- Schlesinger P.H., Gross A., Yin X.M., Yamamoto K., Saito M., Waksman G., & Korsmeyer S.J. (1997) Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 11357-11362.
- Schliephacke T., Meinl A., Kratzmeier M., Doenecke D., & Albig W. (2004) The telomeric region is excluded from nucleosomal fragmentation during apoptosis, but the bulk nuclear chromatin is randomly degraded. *Cell Death Differ.* **11**, 693-703.
- Schneider P., & Tschopp J. (2000) Modulation of death receptor signalling. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **52**, 31-42.
- Screaton G.R., Mongkolsapaya J., Xu X.N., Cowper A.E., McMichael A.J., & Bell J.I. (1997) TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr. Biol.* **7**, 693-696.
- Sedmak J.J. & Grossberg S.E. (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem.* **79**, 544-552.
- Seiter K., Feldman E.J., Halicka H.D., Traganos F., Darzynkiewicz Z., Lake D., & Ahmed T. (1997) Phase I clinical and laboratory evaluation of topotecan and cytarabine in patients with acute leukemia. *J. Clin. Oncol.* **15**, 44-51.
- Seol D.W., Li J., Seol M.H., Park S.Y., Talanian R.V., & Billiar T.R. (2001) Signaling events triggered by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): caspase-8 is required for TRAIL-induced apoptosis. *Cancer Res.* **61**, 1138-1143.
- Shan B., & Lee W.H. (1994) Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **14**, 8166-8173.
- Sheridan J.P., Marsters S.A., Pitti R.M., Gurney A., Skubatch M., Baldwin D., Ramakrishnan L., Gray C., Baker K., Wood W.I., Goddard A.D., Godowski P., & Ashkenazi A. (1997) Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* **277**, 818-821.
- Sherr C.J., & Weber J.D. (2000) The ARF/p53 pathway. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**:94-99.
- Shin E.C., Seong Y.R., Kim C.H., Kim H., Ahn Y.S., Kim K., Kim S.J., Hong S.S., & Park J.H. (2002) Human hepatocellular carcinoma cells resist to TRAIL-induced apoptosis, and the resistance is abolished by cisplatin. *Exp. Mol. Med.* **34**, 114-122.
- Siervo-Sassi R.R., Marrangoni A.M., Feng X., Naoumova N., Winans M., Edwards R.P., & Lokshin A. (2003) Physiological and molecular effects of Apo2L/TRAIL and cisplatin in ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Letters* **190**, 61-72.
- Sinclair W.K., & Morton R.A. (1965) X-ray and ultraviolet sensitivity of synchronized chinese hamster cells at various stages of the cell cycle. *Biophys. J.* **5**, 1-25.
- Singh T.R., Shankar S., Chen X., Asim M., & Srivastava R.K. (2003) Synergistic Interactions of Chemotherapeutic Drugs and Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand/Apo-2 Ligand on Apoptosis and on Regression of Breast Carcinoma *in Vivo*. *Cancer Res.* **63**, 5390-5400.
- Slee E.A., Harte M.T., Kluck R.M., Wolf B.B., Casiano C.A., Newmeyer D.D., Wang H.G., Reed J.C., Nicholson D.W., Alnemri E.S., Green D.R., & Martin S.J. (1999) Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.* **144**, 281-292.
- Smith C.A., Gruss H.J., Davis T., Anderson D., Farrah T., Baker E., Sutherland G.R., Brannan C.I., Copeland N.G., Jenkins N.A. & (1993) CD30 antigen, a marker for Hodgkin's lymphoma, is a receptor whose ligand defines an emerging family of cytokines with homology to TNF. *Cell* **73**, 1349-1360.

- Smith M.L. & Fornace A.J. Jr. (1995) Genomic instability and the role of p53 mutations in cancer cells. *Curr.Opin.Oncol.* **7**, 69-75.
- Smith M.L., Chen I.T., Zhan Q., Bae I., Chen C.Y., Gilmer T.M., Kastan M.B., O'Connor P.M., & Fornace A.J. Jr. (1994) Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* **266**, 1376-1380.
- Song J.H., Song D.K., Petruk K.C., & Hao C. (2003) Cisplatin down-regulation of cellular Fas associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme-like inhibitory proteins to restore tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human melanoma cells. *Clin.Cancer Res.* **9**, 4255-4266.
- Sorensen M., Sehested M., & Jensen P.B. (1995) Characterisation of a human small-cell lung cancer cell line resistant to the DNA topoisomerase I-directed drug topotecan. *Br.J.Cancer* **72**, 399-404.
- Soussi T., Dehouche K., & Beroud C. (2000) p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Hum.Mutat.* **15**, 105-113.
- Speicher M.R., Schoell B., du M.S., Schrock E., Ried T., Cremer T., Störkel S., Kovacs A., & Kovacs G. (1994) Specific loss of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17, and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization. *Am.J.Pathol.* **145**, 356-364.
- Srinivasula S.M., Hegde R., Saleh A., Datta P., Shiozaki E., Chai J., Lee R.A., Robbins P.D., Fernandes-Alnemri T., Shi Y., & Alnemri E.S. (2001) A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* **410**, 112-116.
- Staeher G., & Brkovic D. (1999) The role of surgery in renal cell carcinoma. *Urologe A* **38**, 452-459.
- Stanelle J., & Putzer B.M. (2006) E2F1-induced apoptosis: turning killers into therapeutics. *Trends Mol.Med.* **12**, 177-185.
- Stanelle J., Stiewe T., Theseling C.C., Peter M., & Putzer B.M. (2002) Gene expression changes in response to E2F1 activation. *Nucleic Acids Res.* **30**, 1859-1867.
- Steinbach F., Stockle M., Muller S.C. et al. (1992) Conservative surgery of renal cell tumors in 140 patients: 21 years of experience. *J.Urol.* **148**, 24-29.
- Stephan H., Polzar B., & Mannherz H.G. (2000) "Sein oder nicht sein?" *Naturwissenschaftliche Rundschau* **624**, 273-281.
- Steller H. (1995) Mechanisms and Genes of Cellular Suicide. *Science* **267**, 1445-1449.
- Stevens C., Smith L., & La Thangue N.B. (2003) Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat.Cell Biol.* **5**, 401-409.
- Stiewe T., & Pützer B.M. (2000) Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat.Genet.* **26**, 464-469.
- Störkel S. (1999) Epithelial tumors of the kidney. Pathological subtyping and cytogenetic correlation. *Urologe A* **38**, 425-432.
- Suh W.S., Kim Y.S., Schimmer A.D., Kitada S., Minden M., Andreeff M., Suh N., Sporn M., & Reed J.C. (2003) Synthetic triterpenoids activate a pathway for apoptosis in AML cells involving downregulation of FLIP and sensitization to TRAIL. *Leukemia* **17**, 2122-2129.
- Suliman A., Lam A., Datta R., & Srivastava R.K. (2001) Intracellular mechanism of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene* **20**, 2122-2133.
- Sun S.Y., Yue P., Zhou J.Y., Wang Y., Choi Kim H.R., Lotan R., & Wu G.S. (2001) Overexpression of Bcl2 blocks TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in human lung cancer cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **280**, 788-797.
- Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Brenner C., Larochette N., Prevost M.C., Alzari P.M., & Kroemer G. (1999a) Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J.Exp.Med.* **189**, 381-394.
- Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebersold R., Siderovski D.P., Penninger J.M., & Kroemer G. (1999b) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-446.
- Suzuki Y., Imai Y., Nakayama H., Takahashi K., Takio K., & Takahashi R. (2001) A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol.Cell* **8**, 613-621.
- Takayama S., Sato T., Krajewski S., Kochel K., Irie S., Millan J.A., & Reed J.C. (1995) Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* **80**; 279-284.
- Tamm I., Kornblau S.M., Segall H., Krajewski S., Welsh K., Kitada S., Scudiero D.A., Tudor G., Qui Y.H., Monks A., Andreeff M., & Reed J.C. (2000) Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin.Cancer Res.* **6**, 1796-1803.
- Tamm I., Wang Y., Sausville E., Scudiero D.A., Vigna N., Oltersdorf T., & Reed J.C. (1998) IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* **58**, 5315-5320.
- Tanaka H., Matsumura I., Ezoe S, et al. (2002) E2F1 and c-Myc potentiate apoptosis through inhibition of NF-kappaB activity that facilitates MnSOD-mediated ROS elimination. *Mol.Cell* **9**, 1017-1029.
- Tartaglia L.A., Ayres T.M., Wong G.H., & Goeddel D.V. (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* **74**, 845-853.
- Thakkar H., Chen X., Tyan F., Gim S., Robinson H., Lee C., Pandey S.K., Nwokorie C., & Srivastava R.K. (2001) Pro-survival function of Akt/protein kinase B in prostate cancer cells. *J.Biol.Chem.* **276**, 38361-38369.

- Thoenes W., Störkel S., & Rumpelt H.J. (1986) Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics. *Pathol.Res.Pract.* **181**, 125-143.
- Thomas L.R., Henson A., Reed J.C., Salsbury F.R., & Thorburn A. (2004) Direct binding of Fas-associated death domain (FADD) to the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor DR5 is regulated by the death effector domain of FADD. *J.Biol.Chem.* **279**, 32780-32785.
- Thompson C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462.
- Tomek S., Koestler W., Horak P., Grunt T., Brodowicz T., Pribill I., Halaschek J., Haller G., Wiltschke C., Zielinski C.C., & Krainer M. (2003) TRAIL-induced apoptosis and interaction with cytotoxic agents in soft tissue sarcoma cell lines. *Eur.J.Cancer* **39**, 1318-1329.
- Tsujimoto Y., Cossman J., Jaffe E., & Croce C.M. (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* **228**, 1440-1443.
- Tsurutani J., Nitta T., Hirashima T., Komiya T., Uejima H., Tada H., Syunichi N., Tohda A., Fukuoka M., & Nakagawa K. (2002) Point mutations in the topoisomerase I gene in patients with non-small cell lung cancer treated with irinotecan. *Lung Cancer* **35**, 299-304.
- Uren A.G., Coulson E.J., & Vaux D.L. (1998) Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis repeat proteins (BIRPs) in viruses, nematodes, vertebrates and yeasts. *Trends Biochem.Sci.* **23**, 159-162.
- van Delft MF, & Huang DC (2006) How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Res.* 16:203-213.
- van Valen F., Fulda S., Schafer K.L., Truckenbrod B., Hotfilder M., Poremba C., Debatin K.M., & Winkemann W. (2003) Selective and nonselective toxicity of TRAIL/Apo2L combined with chemotherapy in human bone tumour cells vs. normal human cells. *Int.J.Cancer* **107**, 929-940.
- Verhagen A.M., Silke J., Ekert P.G., Pakusch M., Kaufmann H., Connolly L.M., Day C.L., Tikoo A., Burke R., Wrobel C., Moritz R.L., Simpson R.J., & Vaux D.L. (2002) HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J.Biol.Chem.* **277**, 445-454.
- Verhagen A.M., Ekert P.G., Pakusch M., Silke J., Connolly L.M., Reid G.E., Moritz R.L., Simpson R.J., & Vaux D.L. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**, 43-53.
- Verheij M., & Bartelink, H. (2000) Radiation-induced apoptosis. *Cell Tissue.Res.* **301**, 133-42.
- Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., & Reutelingsperger C. (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J.Immunol.Methods* **184**, 39-51.
- Vogelstein B., Lane D., & Levine A.J. (2000) Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-310.
- Von Haefen C., Gillissen B., Hemmati P.G., Wendt J., Guner D., Mrozek A., Belka C., Dorken B., & Daniel P.T. (2004) Multidomain Bcl-2 homolog Bax but not Bak mediates synergistic induction of apoptosis by TRAIL and 5-FU through the mitochondrial apoptosis pathway. *Oncogene* **50**, 8320-8332.
- Vousden K.H., & Lu X. (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat.Rev.Cancer* **2**, 594-604.
- Wagener C. (1999) Molekulare Onkologie, 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Wagner K.W., Punnoose E.A., Januario T., Lawrence D.A., Pitti R.M., Lancaster K., Lee D., von Goetz M., Yee S.F., Totpal K., Huw L., Katta V., Cavet G., Hymowitz S.G., Amler L., & Ashkenazi A. Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. (2007) *Nat.Med.* **13**, 1070-1077.
- Walczak H., & Haas T.L. (2008) Biochemical analysis of the native TRAIL death-inducing signaling complex. *Methods Mol.Biol.* **414**, 221-239.
- Walczak H., Koschney R., Willen D., Schader M.B., Sykora J., Ganten T.M., & Haas T.L. (2006) "The TRAIL Receptor-Ligand System: Biochemistry of Apoptosis Induction, Therapeutic Potential for Cancer Treatment and Physiological Function". *Apoptosis and Cancer Therapy* **1**, 31-92.
- Walczak H., & Krammer P.H. (2000) The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp.Cell Res.* **256**, 58-66.
- Walczak H., Miller R.E., Ariail K., Gliniak B., Griffith T.S., Kubin M., Chin W., Jones J., Woodward A., Le T., Smith C., Smolak P., Goodwin R.G., Rauch C.T., Schuh J.C.L., & Lynch D. (1999) Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat.Med.* **5**, 157-163.
- Walczak H., Degli-Esposti M.A., Johnson R.S., Smolak P.J., Waugh J.Y., Boiani N., Timour M.S., Gerhart M.J., Schooley K.A., Smith C.A., Goodwin R.G., & Rauch C.T. (1997) TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* **16**, 5386-5397.
- Walensky L.D. (2006) BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. *Cell Death Differ.* **13**, 1339-1350.
- Walker N.P., Talanian R.V., Brady K.D., Dang L.C., Bump N.J., Ferenz C.R., Franklin S., Ghayur T., Hackett M.C., & Hammill L.D. (1994) Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* **78**, 343-352.
- Wallace-Brodeur R.R., & Lowe S.W. (1999) Clinical implications of p53 mutations. *Cell Mol.Life Sci.* **55**, 64-75.
- Wang J., Lobito A.A., Shen F., Hornung F., Winoto A., & Lenardo M.J. (2000) Inhibition of Fas-mediated apoptosis by the B cell antigen receptor through c-FLIP. *Eur.J.Immunol.* **30**, 155-163.
- Wang S., & El-Deiry W.S. (2003a) TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* **22**, 8628-8633.

- Wang S., & El-Deiry W.S. (2003b) Requirement of p53 targets in chemosensitization of colonic carcinoma to death ligand therapy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 15095-15100.
- Warburton H.E., Brady M., Vlatkovic N., Linehan W.M., Parsons K., & Boyd M.T. (2005) p53 regulation and function in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **65**, 6498-6503.
- Weber J.D., Taylor L.J., Roussel M.F., Sherr C.J., & Bar-Sagi D. (1999) Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat.Cell Biol.* **1**, 20-26.
- Webb J.L. (1963) Effects of more than one inhibitor. *Enzymes Metab.Inhibitors.* **1**, 487-512.
- Wen J., Ramadevi N., Nguyen D., Perkins C., Worthington E., & Bhalla K. (2000) Antileukemic drugs increase death receptor 5 levels and enhance Apo-2L-induced apoptosis of human acute leukemia cells. *Blood* **96**, 3900-3906.
- Wethkamp N. (2006) Die Rolle der Apoptose-relevanten Faktoren Daxx und DAP-Kinase im humanen Nierenzellkarzinom [Dissertation]. Düsseldorf: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Heinrich-Heine-Universität.
- Wiezorek J., Holland P., & Graves J. (2010) Death receptor agonists as a targeted therapy for cancer. *Clin.Cancer Res.* **16**, 1701-1708.
- Wiley S.R., Schooley K., Smolak P.J., Din W.S., Huang C.P., Nicholl J.K., Sutherland G.R., Smith T.D., Rauch C., Smith C.A., et al. (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* **3**, 673-682.
- Williams G.T., Smith C.A., McCarthy N.J., & Grimes E.A. (1992) Apoptosis: final control point in cell biology. *Trends Cell Biol.* **2**, 263-267.
- Wilson K.P., Black J.A., Thomson J.A., Kim E.E., Griffith J.P., Navia M.A., Murcko M.A., Chambers S.P., Aldape R.A., Raybuck S.A., & Livingston D.J.(1994) Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* **370**, 270-275.
- Wittmann S. (2007) Re-Expression von Caspase-8 und Sensitivierung für TRAIL-induzierte Apoptose durch Methotrexat [Dissertation]. München: Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität.
- Winter S., & Weller M. (1998) Potentiation of CD95L-induced apoptosis of human malignant glioma cells by topotecan involves inhibition of RNA synthesis but not changes in CD95 or CD95L protein expression. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **286**, 1374-1382.
- Wrzesien-Kus A., Smolewski P., Sobczak-Pluta A., Wierzbowska A., & Robak T. (2004) The inhibitor of apoptosis protein family and its antagonists in acute leukemias. *Apoptosis.* **9**, 705-715.
- Wu G.S., Burns T.F., McDonald E.R. 3rd, Jiang W., Meng R., Krantz I.D., Kao G., Gan D.D., Zhou J.Y., Muschel R., Hamilton S.R., Spinner N.B., Markowitz S., Wu G., & El-Deiry W.S. (1997) KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat.Genet.* **17**, 141-143.
- Wu L., Timmers C., Maiti B., Saavedra H.I., Sang L., Chong G.T., Nuckolls F., Giangrande P., Wright F.A., Field S.J., Greenberg M.E., Orkin S., Nevins J.R., Robinson M.L., & Leone G. (2001) The E2F-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* **414**, 457-462.
- Wu X., Kakehi Y., Mizutani Y., Nishiyama H., Kamoto T., Megumi Y., Ito N., Ogawa O. (2003) Enhancement of TRAIL/APO2L-mediated apoptosis by Adriamycin through inducing DR4 and DR5 in renal cell carcinoma cells. *Int.J.Cancer* **104**, 409-417.
- Wu X., & Levine A.J. (1994) p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 3602-3606.
- Wunderlich H., Schumann S., Janitzky V., Moravek P., Podhola M., Kosmehl H., & Schubert J. (1999) Increased incidence of renal cell carcinoma in central Europe. Does diagnostic increase reflect a true increase in incidence?. *Urologe A* **38**, 252-257.
- Xiang H., Fox J.A., Totpal K., Aikawa M., Dupree K., Sinicropi D., Lowe J., & Escandón E. (2002) Enhanced tumor killing by Apo2L/TRAIL and CPT-11 co-treatment is associated with p21 cleavage and differential regulation of Apo2L/TRAIL ligand and its receptors *Oncogene* **21**, 3611-3619.
- Yamanaka T., Shiraki K., Sugimoto K., Ito T., Fujikawa K., Ito M., Takase K., Moriyama M., Nakano T., & Suzuki A. (2000) Chemotherapeutic agents augment TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Hepatology* **32**, 482-490.
- Yamasaki L. (2003) Role of the RB tumor suppressor in cancer. *Cancer Treat.Res.* **115**, 209-239.
- Yan Y., Mahotka C., Heikaus S., Shibata T., Wethkamp N., Liebmann J., Suschek C.V., Guo Y., Gabbert H.E., Gerharz C.D., & Ramp U. (2004) Disturbed balance of expression between XIAP and Smac/DIABLO during tumour progression in renal cell carcinomas. *Br.J.Cancer* **91**, 1349-1357.
- Yang X.H., Sladek T.L., Liu X., Butler B.R., Froelich C.J., & Thor A.D. (2001) Reconstitution of caspase-3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin- and etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res.* **61**, 348-354.
- Yu J., Zhang L., Hwang P.M., Rago C., Kinzler K.W., & Vogelstein B. (1999) Identification and classification of p53-regulated genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 14517-14522.
- Yuan J., Shaham S., Ledoux S., Ellis H.M., & Horvitz H.R. (1993) The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* **75**, 641-652.
- Yuan J.M., Castelao J.E., Gago-Dominguez M., Ross R.K., & Yu M.C. (1998a) Hypertension, obesity and their medications in relation to renal cell carcinoma. *Br.J.Cancer* **77**, 1508-1513.
- Yuan J.M., Castelao J.E., Gago-Dominguez M., Yu M.C., & Ross R.K. (1998b) Tobacco use in relation to renal cell carcinoma. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **7**, 429-433.

- Zamzami N., Marchetti P., Castedo M., Zanin C., Vayssiere J.L., Petit P.X., & Kroemer G. (1995) Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J.Exp.Med.* **181**, 1661-1672.
- Zhang L., & Fang B. (2005) Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene.Ther.* **12**, 228-237.
- Zhivotovsky B., Joseph B., & Orrenius S. (1999) Tumor radiosensitivity and apoptosis. *Exp.Cell Res.* **248**, 10-17.
- Zhou M., Gu L., Li F., Zhu Y., Woods W.G., & Findley H.W. (2002) DNA damage induces a novel p53-survivin signaling pathway regulating cell cycle and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **303**, 124-131.
- Zindy F., Eischen C.M., Randle D.H., Kamijo T., Cleveland J.L., Sherr C.J., & Roussel M.F. (1998) Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev.* **12**, 2424-2433.
- Zou H., Li Y., Liu X., & Wang X. (1999) An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J.Biol.Chem.* **274**, 11549-11556.
- Zou H., Henzel W.J., Liu X., Lutschg A., & Wang X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**, 405-413.

9 Publikationsverzeichnis

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Heikaus S., **Caliskan E***, Mahotka C., Gabbert H.E., & Ramp U. (2007) Differential gene expression in anticancer drug- and TRAIL-mediated apoptosis in renal cell carcinomas. *Apoptosis* **12**, 1645-1657.

**Der Autor teilt sich "gleichberechtigt die Erstautorschaft" dieser Arbeit.*

Ramp U., Krieg T., **Caliskan E.**, Mahotka C., Ebert T., Gabbert H.E., & Gerharz C.D. (2004) XIAP expression is an independent prognostic marker in clear-cell renal carcinoma. *Hum Pathol.* **35**, 1022-1028.

Ramp U., **Caliskan E.**, Mahotka C., Krieg A., Heikaus S., Gabbert H.E., & Gerharz C.D. (2003) Apoptosis induction in renal cell carcinoma by TRAIL and gamma-radiation is impaired by deficient caspase-9 cleavage. *Br.J.Cancer* **88**, 1800-1807.

Ramp U., **Caliskan E.**, Ebert, T., Karagiannidis R., Willers R., Gabbert H.E., & Gerharz C.D. (2002) FHIT expression in clear cell renal carcinomas: versatility of protein levels and correlation with survival. *J.Pathol.* **196**, 430-436.

10 Vortrags- und Präsentationsverzeichnis

Heikaus S., **Caliskan E.**, Mahotka C., Gerharz C.D., Gabbert H.E., & Ramp U. Topotecan-resistant and -sensitive renal carcinoma cell lines: A comparative cDNA-array analysis. 89. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 18.-21.05. 2005 in Wuppertal, *Vortrag.*

Heikaus S., **Caliskan E.**, Mahotka C., Gabbert H.E., Gerharz C.D., & Ramp U. Analysis of TRAIL-resistant and -sensitive renal carcinoma cell lines by comparative cDNA-analysis. 13. Internationaler AEK/AIO Kongress der Deutschen Krebsgesellschaft, 13.-16.03. 2005 in Würzburg, *Posterpräsentation.*

Heikaus S., **Caliskan E.**, Mahotka C., Gabbert H.E., Gerharz C.D., & Ramp U. Comparative cDNA-array analysis of TRAIL-sensitive and -resistant renal carcinoma cell lines. 88. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 02.-05. 06. 2004 in Rostock, *Posterpräsentation.*

Heikaus S., **Caliskan E.**, Mahotka C., Gabbert H.E., Gerharz C.D., & Ramp U. TRAIL-induced apoptosis and Caspase-8-inhibiting proteins in renal cell carcinoma. 88. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 02.-05. 06. 2004 in Rostock, *Posterpräsentation.*

Heikaus S., **Caliskan E.**, Mahotka C., Gabbert H.E., & Gerharz C.D. The role of caspase-8 cleavage in TRAIL-induced apoptosis of renal cell carcinomas. 26. Deutscher Krebskongress, 27.02.-01.03. 2004 in Berlin, *Posterpräsentation.*

Ramp U., Krieg T., **Caliskan E.**, Mahotka C., Heikaus S., Gabbert H.E., & Gerharz C.D. XIAP expression as a novel prognostic marker in clear cell renal carcinomas. 87. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 10.-14.06. 2003 in Bamberg, *Posterpräsentation.*

Heikaus S., **Caliskan E.**, Mahotka C., Krieg A., Gabbert H.E., Gerharz C.D., & Ramp U. Apoptosis-induction in renal cell carcinomas by TRAIL and γ -radiation is impaired by deficient caspase-9 cleavage. 87. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 10.-14.06. 2003 in Bamberg, *Posterpräsentation.*

Heikaus S., **Caliskan E.**, Mahotka C., Krieg T., Gabbert H.E., Gerharz C.D., & Ramp U. XIAP expression as an independent prognostic marker in clear cell renal carcinomas. 12. Internationaler AEK/AIO Kongress der Deutschen Krebsgesellschaft, 25.-28.03. 2003 in Würzburg, *Posterpräsentation.*

11 Abbildungsverzeichnis

Kapitelbezogene Nummerierung:

Abb. 1.1:	Schematische Darstellung der morphologischen Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose.....	10
Abb. 1.2:	Die Familie der Apoptose-relevanten Caspasen	11
Abb. 1.3:	Die Rezeptoren des TRAIL-Systems	17
Abb. 1.4:	Signalwege der TRAIL-vermittelten Apoptose.....	19
Abb. 1.5:	Vereinfachte Übersichtsdarstellung der Signalwege von p53 und E2F1.....	26
Abb. 1.6:	Signalwege der E2F1-induzierten Apoptose	29
Abb. 4.1:	Effekte der Topotecan- oder TRAIL-induzierten Apoptose auf die Zellzahl in Nierenkarzinomzelllinien.....	54
Abb. 4.2:	Morphologische Nachweis Topotecan- oder TRAIL-induzierter Apoptose in Nierenkarzinomzelllinien	55
Abb. 4.3:	Northern Blot Analysen zur Überprüfung der durch rhs-TRAIL oder Topotecan induzierten differentiellen Genexpression in der sensitiven Zelllinie clearCa-6 und der resistenten Zelllinie clearCa-7.....	59
Abb. 4.4:	Schematische Übersichtsdarstellung der in Topotecan- oder TRAIL-vermittelter Apoptose (a bzw. b) differentiell exprimierten Gene in der sensitiven Nierenkarzinomzelllinie clearCa-6	62
Abb. 4.5:	Schematische Übersichtsdarstellung der in Topotecan- oder TRAIL-vermittelter Apoptose (c bzw. d) differentiell exprimierten Gene in der resistenten Nierenkarzinomzelllinie clearCa-7	65
Abb. 4.6:	Wachstumsbilanz von Nierenkarzinomzelllinien nach 72-stündiger Exposition mit rekombinanten humanen und löslichen TRAIL-Liganden.....	67
Abb. 4.7:	Lichtmikroskopische Aspekte der Zelllinie clearCa-6 vor (a) und nach (b) Exposition mit rekombinanten TRAIL-Liganden – siehe auch Abb. 4.2 (a und e)	68
Abb. 4.8:	Wachstumsbilanz von Nierenkarzinomzelllinien nach Exposition für 72 Stunden mit rekombinanten TRAIL-Liganden und ionisierender Gamma-Strahlung alleine oder in Kombination	69
Abb. 4.9:	Western Blot Analyse von PARP und den Effektor-Caspasen nach Exposition von clearCa-22 mit rhs-TRAIL und Gamma-Strahlung alleine oder in Kombination.....	71
Abb. 4.10:	Western Blot Analyse der Initiator-Caspase-8 und -9 nach Exposition von clearCa-22 mit rhs-TRAIL und ionisierender Gamma-Strahlung alleine oder in Kombination.....	71
Abb. 4.11:	Western Blot Analyse der Apoptose-regulierenden Proteine in clearCa-22 nach Exposition mit rhs-TRAIL und ionisierender Gamma-Strahlung alleine oder in Kombination.....	73

12 Tabellenverzeichnis

Kapitelbezogene Nummerierung:

Tab. 1.1:	Alphabetische Auflistung verschiedener Caspase-Substrate	12
Tab. 1.2:	Mögliche Resistenzmechanismen gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose in Tumorzellen.....	21
Tab. 1.3:	Modulation der TRAIL-induzierten Apoptose durch Zytostatika oder Bestrahlung	31
Tab. 2.1:	Übersicht der verwendeten humanen Nierenkarzinomzelllinien	34
Tab. 2.2:	Verwendete Zytostatika, Zytokine, Apoptose-Induktoren und Bestrahlung.....	34
Tab. 2.3:	Liste der verwendeten DNA-Längenstandards.....	35
Tab. 2.4:	Liste der verwendeten Oligonukleotide (Primer)	35
Tab. 2.5:	Verwendete Protein-Molekulargewichtsstandards.....	36
Tab. 2.6:	Verwendete Enzyme	36
Tab. 2.7:	Liste der verwendeten Primärantikörper	36
Tab. 2.8:	Liste der verwendeten molekularbiologischen Kits.....	37
Tab. 2.9:	Liste der verwendeten Geräte.....	38
Tab. 2.10:	Übersicht der verwendeten Software und Server.....	38
Tab. 4.1:	Ergebnis der cDNA-Microarray Analyse für die gewählten Gene nach Exposition mit Topotecan	57

13 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Acinus	Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus
ad	auf
ADR	Adriamycin
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AIF	Apoptosis inducing factor
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
ANT	Adenin-Nukleotid-Transporter
APAF-1	Apoptotic Protease Activity Factor-1
APC	Adenomatous polyposis coli
APO-2L	Apoptosis-2 ligand
APP	Amyloid-Precursor-Protein
APS	Ammoniumpersulfat
AraC	Cytarabin
ARF	Alternative reading frame
ASPP	Apoptosis-stimulating protein for p53
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
Bad	BCL2-associated agonist of cell death
Bag-1	BCL2-associated athanogene
Bak1	Bcl-2-antagonist/killer 1
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bcl-2A1	BCL2-related protein A1
Bcl-X _{LS}	lange (L) und kurze (S) Form des BCL2-ähnlichen Genproduktes X
BH	Bcl-2-Homolog
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
BIR	Baculoviral IAP Repeat
BIRCs	BIR containing proteins
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein
Bp	Basenpaare
BRUCE	BIR Repeat containing Ubiquitin-Conjugating Enzyme
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAD	Caspase-Activated Deoxyribonuclease
CARD	Caspase Recruitment Domain
Caspase	Cystein-Aspartat-Protease
CCNU	Chlorethyl-cyclohexyl-nitroso-urea (Lomustin)
CD	Cluster of differentiation
CD95	CD95-Rezeptor
CD95L	CD95-Ligand
Cdc	Cell division cycle
CDDO	2-Cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oic acid
CDK	Cyclin dependent kinase
cDNA	complementary DNA
CDS	coding sequence
c-FLIP	cellular Flice Inhibitory Protein
CHK	Checkpoint kinase
CHL	Chlorambucil

Ci	Curie
c-IAP	cellular IAP
CIP1	CDK interacting protein (p21 ^{WAF1})
CK	Creatinkinase
clearCa	clear cell renal cell carcinoma
cm	centimeter (Zentimeter)
CO ₂	Carbondioxid (Kohlendioxid)
cpm	counts per minute
CPT	Camptothecin
CPT-11	Camptothecin-Derivat Irinotecan
CRD	Cystein-reiche Domäne
CsCl	Caesiumchlorid
Cyt.c	Cytochrom c
dATP	Desoxy-ATP
DcR	Decoy Rezeptor
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DD	Death Domain
ddNTP	2,3-didesoxy-NTP
DDP	Diammindichloroplatin (II) (Cisplatin)
DED	Death Effector Domain
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIABLO	Direct IAP Binding Protein with Low pI
DISC	Death Inducing Signalling Complex
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNA-PKcs	Katalytische Untereinheit (catalytic subunit) der DNA-abhängigen Proteinkinase
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DR	Death Receptor
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DXR	Doxorubicin
E2F1	E2F transcription factor 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FA	Formaldehyd
FADD	Fas Associated Death Domain
FBS	Fetal Bovin Serum
FLIP	Fllice Inhibitory Protein
FLU	Fludarabin
G	Guanin
<i>g</i>	gravitational acceleration
g	Gramm
G1/2-Phase	Gap1/2-Phase
GADD45	Growth arrest and DNA-damage Inducible
GAL4	Säugetierhomolog zu GAL4p
GEM	Gemcitabin
GITC	Guanidiniumisothiocyanat
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GPX	Glutathionperoxidase
Gy	Gray

H⁺	Hydrogenium(Wasserstoff)-Ionen
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Her-2	Tyrosin-Proteinkinase-Rezeptor HER2
HIP-55	HPK1-interacting protein of 55 kDa
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HK	Hexokinase
hnRNP	heteronukleäres Ribonukleoprotein
HPK1	Hematopoietic progenitor kinase 1
HPLC	high performance liquid chromatography
HPRT1	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase
HRP	Horseradish Peroxidase
HS1	Hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1
HSF	Heat Shock Factor
Hsp90	Heat shock protein 90 (KDa)
HtrA2	High temperature requirement A
IAP	
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
IARC	International Academy for Research on Cancer
iASPP	Inhibitor of ASPP
IBM	IAP-binding motif
ICAD	Inhibitor of Caspase-Activated Deoxyribonuclease
ICE	Interleukin-1 β -Converting Enzyme
Ig	Immunoglobulin
ILP2	IAP-like protein
ion.	ionisierende
I- κ B α	α -Isoform des NF- κ B-Inhibitors
J16	
J16	Jurkat Klon 16
JMY	Junction-Mediating and Regulatory Protein
JNK	c-Jun N-terminale kinase
Kb	
Kb	Kilobasenpaare
KDa	Kilodalton
L	
L	liter
LARD	Lymphocyte associated receptor of death
LIT	Lymphocyte inhibitor of TRAIL
M	
M	Molare Masse
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence
MDM2	Murine double minute
MDR1	Multidrug Resistance
MEKK	MAP/ERK Kinase Kinase
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
ML-IAP	Melanoma-IAP
mM	Millimolar
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mmol	Millimol
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
M-Phase	Mitose-Phase
mRNA	Messenger RNA
MT	Mutation
Myc	Myelocytomatosis oncogene

Na₂HPO₄	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NAIP	Neuronal Apoptosis-Inhibitory Protein
NB	Northern Blot
NCBI	National Center for Biotechnology Information (PubMed)
NF-κB	Nuclear Factor-κB
ng	Nanogramm
NGF	Nerve Growth Factor
NIK	NF-κB-induzierende Kinase
Nonidet p40 (NP-40)	4-Nonylphenyl-polyethylene glycol
OPG	Osteoprotegerin
p.A.	pro Analysis
p14^{ARF}	Alternativ reading frame - Produkt des Genlocus CDKN2A
p16^{INK4A}	CDK-Inhibitor 2A (16 KDa)
p19^{INK4D}	CDK-Inhibitor 2D (19 KDa)
p21^{CIP1/WAF1}	Cyclin dependent kinase inhibitor 1A (21 KDa)
p49	MAPK 10 (49 KDa)
p53	Tumorsuppressorprotein (53 KDa)
p57^{KIP2}	CDK-Inhibitor 1C (57 KDa)
PA	Paclitaxel
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK2	p21-activated kinase
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBR	Peripheral-type Benzodiazepine Receptor
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Zehnerlogarithmus der H ⁺ -Ionen-Aktivität (Potenz)
Pk	Positivkontrolle
PKB	Proteinkinase B (Akt)
PKC	Proteinkinase C
pmol	Pikomol
poly(A)	poly(Adenin)
PRK2	Protein kinase C related kinase
PT	Permeabilitäts-Transition
PTPC	Permeability Transition Pore Complex
Puma	p53 upregulated modulator of apoptosis
Rad51	Säugetierhomolog zu RecA
Rad9	Säugetierhomolog zu DNA-repair-exonuclease rad9
Ras	Ras (Rat sarcoma)-Protein
Ras-GAP	Ras GTPase activating protein
Rb	Retinoblastom-Protein
rhs	recombinant human soluble
RIP	Receptor interacting protein
RNA	Ribonucleic acid
ROCK-1	Rho-assozierte Kinase-1
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
s	Sekunde
S	Svedberg-Einheit
SAPK	Stress-Aktivierte Proteinkinase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Smac	Second mitochondrial derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI
S-Phase	(DNA) Synthese-Phase
SSC	Saline sodium citrate

STRAP	Serine/Threonine Kinase Receptor Associated Protein
Susp.	Suspensionszellen
T	Thymin
TAF6	(TBP)-associated factor 6
T-ALL	T-Zell-akute lymphoblastische Leukämie
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
tBid	truncated Bid
TBP	TATA box binding protein
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
The CASBAH	The CASpase Substrate dataBAse Homepage
TNF/TNF α	Tumor necrosis factor/-alpha
TNF-R	TNF-Rezeptor
TO	Topotecan
TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain
TRAF	TNF receptor-associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TRAMP	Translocating chain-association membrane protein
TRID	(TRAIL receptor) decoy without an intracellular domain
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRUNDD	decoy with truncated death domain
U	Unit
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
v	Volumen
VB	Vinblastin
VCR	Vincristin
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel
VHL	Von Hippel-Lindau Syndrom
VP-16	Etoposid
w	weight
WAF1	Wild-type p53 activated fragment (p21 ^{CIP1})
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
XIAP	X-chromosome-linked IAP
XRCC4	X-ray repair cross-complementing protein 4
5-FU	5-Fluoruracil
³² P	radioaktives Phosphor 32-Isotop
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
λ	Wellenlänge

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich ganz herzlich bei allen Menschen, die mich während meiner Promotionszeit fachlich wie auch persönlich unterstützt und somit maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt...

Herrn Prof. Dr. H. E. Gabbert für die freundliche Aufnahme in sein Institut, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. C. D. Gerharz für die Überlassung des hochinteressanten Themas, für die stete Unterstützung und die fortwährende Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft. Insbesondere gilt mein Dank seinem hohen persönlichen Engagement und Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. U. Ramp für die sehr gute und intensive wissenschaftliche Betreuung, die zahlreichen motivierenden Diskussionen, die kritische Durchsicht des Manuskripts und für die ausgeprägte Höflichkeit.

Herrn Prof. Dr. T. Klein für die freundliche Übernahme der Betreuung und Begutachtung in der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Herrn PD Dr. C. Mahotka für die kritische Anmerkungen, Hilfestellungen sowie für die unerschöpfliche Diskussionsbereitschaft und den großen Ansporn beim Entstehen dieser Arbeit.

Meinem Freund Herrn PD Dr. S. Heikus für die ideenreiche und effektive Zusammenarbeit bei gemeinsamen Projekten und Publikationen.

Den ehemaligen Mitarbeitern, insbesondere Sigrid, Janine und Sandra und meinen damaligen Mitstreitern Thomas Krieg (Dipl.-Biol.), Jörg Liebmann (Dr. rer. nat.) und Nils Wethkamp (Dr. rer. nat.) – das war eine "Supertruppe". Mein Dank gilt insbesondere ihrer tatkräftigen Unterstützung sowie der angenehmen und humorvollen Arbeitsatmosphäre im Labor.

Meinen Freunden, insbesondere Hülya Sancak (M.A. phil.), German Heeg (Business Manager), Iris Heiermann (Ärztin), Gürsel Karadağ (Dipl.-Designer), Familie Yalçın, Aytunç Sular und meinen promovierten Studienkollegen Raif Yücel, Zakir Özcan und Özer Değıştirici, die mir jederzeit mit professionellem Rat und Tat zur Seite standen und für die notwendige Ablenkung sorgten.

Meinen Eltern und meiner Familie im Heimatland für den in jeder Hinsicht grenzenlosen Rückhalt.

In respektvoller Erinnerung an meinen Vater – er wäre sicher noch stolzer gewesen.

Abschliessend gilt mein herzlicher Dank meiner Frau Filiz (♥) und meiner Tochter Melis (♥), die mich stets bei meinem Vorhaben gefördert und unterstützt haben und "meine Launen", besonders in den schwierigen Phasen, mit viel Geduld ertragen haben – deshalb ist Ihnen diese Arbeit gewidmet. Danke, ohne Euch wäre ich heute nicht da, wo ich jetzt bin.

Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beobachtung der "Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf" erstellt worden ist. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 03.09.2012

(Ercan Caliskan)