

Aus dem Institut für Pathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. H.E. Gabbert

**Apoptoseinduktion in Nierenkarzinomzelllinien durch
rekombinante Toxine**

Dissertation

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

vorgelegt von
Adrian Gerhard Grund
2003

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

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

Referent: Prof. Dr. C.D. Gerharz

Korreferent: Prof. Dr. W.A. Schulz

DANKSAGUNG

Die in dieser Arbeit benutzten rekombinanten Toxine wurden uns freundlicherweise von Herrn Dr. Winfried Wels, Klinik für Tumorbologie, Freiburg im Breisgau, zur Verfügung gestellt. Mein Dank gilt auch Herrn Dipl. Biol. Mathias Schmidt desselben Institutes für die Bereitstellung der Proben.

Für die freundliche Einarbeitung danke ich Frau Anja Florange-Heinrichs, die mir bei der Laborarbeit mit Rat und Tat behilflich war.

Besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Petra Reinecke für die Betreuung der vorliegenden Arbeit als auch meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. C.D. Gerharz, der mir mit Anregung und Diskussion jederzeit zur Verfügung stand.

Meiner Familie gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

<u>1</u>	<u>Einleitung</u>	<u>6</u>
1.1	Das Nierenzellkarzinom	6
1.2	Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	9
<u>2</u>	<u>Wachstumsfaktorrezeptoren und ihre Liganden</u>	<u>11</u>
2.1	Wachstumsfaktoren	11
2.1.1	Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF).....	11
2.1.2	TGF- α	12
2.2	Wachstumsfaktorrezeptoren – Die EGF-Rezeptor-Familie ..	13
2.2.1	EGF-Rezeptor (Epidermal-growth-factor-receptor)	14
2.2.2	ERBB-2-Rezeptor.....	18
2.2.3	Rezeptorinteraktionen durch Heterodimerisierung	18
<u>3</u>	<u>Antikörpertoxine</u>	<u>21</u>
3.1	Pseudomonas aeruginosa Exotoxin A	22
3.2	scFv(FRP5)-ETA	23
3.3	scFv(225)-ETA	25
3.4	TGF- α -ETA	26
<u>4</u>	<u>Formen des Zelltodes: Apoptose und Nekrose</u>	<u>28</u>
<u>5</u>	<u>Material und Methoden.....</u>	<u>29</u>
5.1	Zelllinien und Zellkultur	29
5.2	MTT-Test	31
5.3	Histologie und Hämatoxylin-Eosin-Färbungen.....	33
5.4	Cell death detection ELISA ^{PLUS®}	34

5.5	ERBB-2-Rezeptorstatus	37
5.5.1	Proteinpräparation.....	38
5.5.2	Quantitative Gesamtproteinbestimmung nach Bradford.....	38
5.5.3	Tris-Glyzin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	42
<u>6</u>	<u>Ergebnisse</u>	<u>48</u>
6.1	MTT-Zellproliferationsassay.....	48
6.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbungen: Mitose- und Apoptoserate.	57
6.3	Cell death detection ELISA ^{PLUS®}	62
6.4	Westernblot-Analyse.....	66
6.5	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	67
<u>7</u>	<u>Diskussion</u>	<u>68</u>
<u>8</u>	<u>Referenzen</u>	<u>74</u>
<u>9</u>	<u>Lebenslauf.....</u>	<u>93</u>

1 Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom

Epidemiologie. Das Nierenzellkarzinom (human renal cell carcinoma, hRCC) hat eine Inzidenz von 6 bis 10 pro 100.000 Einwohnern und macht 2-3 Prozent aller bösartigen Tumoren beim Menschen aus. Etwa 85 Prozent aller bösartigen Nierentumoren entfallen auf das Nierenzellkarzinom (*Walker et al., 1998*). Der Häufigkeitsgipfel der Erkrankung liegt jenseits des 50. Lebensjahres, wobei etwa doppelt so viele Männer wie Frauen betroffen sind. Eine familiäre Häufung zeigt sich bei reziproker Translokation der Chromosomen 3 und 8 ($t(3:8),(21:q24)$); häufiger ist jedoch das sporadische, nicht-familiäre Auftreten.

Ätiologie. Die eigentlichen Ursachen des Nierenzellkarzinoms sind unbekannt. Als karzinogene Faktoren werden Nikotinabusus (*McCredie et al., 1992*), Obesitas, Kaffeegenuß, Phenacetinabusus und auch Virusinfektionen der Niere diskutiert (*Classen et al., 1993*) und unterschiedlich bewertet (*Wolk et al., 1996 a/b*). Relativ einheitlich weisen Studien auf einen protektiven Effekt von grünem Gemüse hin; ernährungsbedingt aufgenommene Nitrosamine und ihre Vorstufen scheinen für das Auftreten von hRCC keine Rolle zu spielen (*Yuan et al., 1998*). In internationalen Multi-centerstudien ist das gehäufte Vorkommen von Nierenzellkarzinomen mit einer Beschäftigung in der Hochofen-Industrie sowie der eisen- und stahlverarbeitenden Industrie vergesellschaftet. Auch Asbestexposition geht mit einem erhöhten Risiko für hRCC einher (*Mandel et al., 1995; McCredie et al., 1993*).

Klinik. Das Nierenzellkarzinom neigt relativ früh zum Einbruch in die Nierenvene per continuitatem und damit zur hämatogenen Metastasierung in Lunge, Leber, Knochen und Gehirn sowie in die kontralaterale Niere. Zum Zeitpunkt der Diagnose weisen bereits mindestens 25 Prozent der Patien-

ten hämatogene Fernmetastasen auf, wobei die metastatische Tumoraus-
saat mit der Tumorgöße des Primarius korreliert: Bei Tumoren von 3-6
Zentimetern Durchmesser werden Metastasen in 10 Prozent, bei Tumoren
über 10 Zentimetern Durchmesser in 80 Prozent aller Fälle beobachtet.
Da Nierenzellkarzinome in den meisten Fällen entweder völlig symptomlos
bleiben oder symptomarm sind, ist die Diagnose häufig ein Zufallsbefund
der Routinesonographie (Ou et al., 1998).

Einteilung nach TNM-System.

T1	≤ 7cm, begrenzt auf die Niere
T2	> 7cm, begrenzt auf die Niere
T3a	Invasion in NNR oder perirenales Gewebe innerhalb der Gerota-Faszie
T3b	- in Nierenvene oder V. cava unterhalb des Zwerchfells
T3c	- in V. cava oberhalb des Zwerchfells
T4	- jenseits der Gerota-Faszie
N1	Solitäre Lymphknotenmetastase
N2	mehr als eine regionäre Lymphknotenmetastase

(aus: *Onkologie 1998/99 Empfehlungen zu Therapie, Onkologische Arbeitsgemeinschaft
Saar-Pfalz-Mosel-E.V.*)

Therapie. Für die kurative Therapie ist die radikale Tumornephrektomie
und Lymphadenektomie im Stadium M₀ (Motzer et al., 1997) die Therapie
der Wahl (Novick et al., 1992). Die radikale Nephrektomie sollte auch bei
Tumorbefall von Rest- oder Einzelnieren zugunsten der kurativen Ziel-
setzung erfolgen. Inwieweit die partielle Nephrektomie unter geeigneten
Voraussetzungen einem kurativen Ansatz genügen kann, ist zum gegen-
wärtigen Zeitpunkt noch Gegenstand klinischer Follow-up-Studien (Buizza
et al., 1997); das Risiko von Lokalrezidiven scheint jedoch höher zu sein
als bei der radikalen Tumornephrektomie.

Eine chirurgische Intervention ist beim metastasierten Nierenzellkarzinom bestenfalls palliativ sinnvoll; bei T₁₋₃-Tumoren ohne Fernmetastasierung kommen die En-bloc-Entfernung von Tumor und Niere mit perirenal Fettkapsel, der Nebenniere, dem Harnleiter und der Spermatika- bzw. Ovarikagefäße mit regionärer paraaortaler bzw. parakavaler Lymphadenektomie und eventueller Freiräumung von Tumorzapfen aus der Vena cava (ggf. Kavamanschettenresektion) zum Einsatz. Zudem scheint die operative Entfernung solitärer Fernmetastasen gerechtfertigt (*Kavolius et al., 1998; Langer et al., 1997*). Bei T₄-Tumoren kommt die Embolisation des Tumors mit einem Gewebekleber über die A. renalis als palliativer Eingriff in Betracht.

Menschliche Nierenzellkarzinome sind sowohl strahlen- als auch nahezu chemotherapieresistent (*Aref et al., 1997; Motzer et al., 1997*). Für das metastasierte Nierenzellkarzinom existiert zum gegenwärtigen Zeitpunkt kein etabliertes oder standardisiertes Therapieschema. Die Gabe von Androgenen oder Progesteron zeigte nur geringe Erfolge und ist heutzutage von untergeordneter Bedeutung. Unter Interferontherapie sind vereinzelt Remissionen von 6 Monaten und mehr beobachtet worden (*Aulitzky et al., 1989*). In den letzten 10 Jahren hat sich die Immuntherapie zur Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms zunehmend etabliert. Die Zytokine Interleukin-2 und Interferon- α haben als Einzelsubstanzen die größten Effekte für die Therapie von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom gezeigt. Zunehmend wird auch die Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms mit hRCC-affinen Radiopharmaka erprobt (*Shukla et al., 1997*).

Prognose. Die durchschnittliche Überlebensdauer nach Diagnose beträgt in Abhängigkeit von Tumorgrad und Staging weniger als fünf Jahre, nach erfolgter Metastasierung etwa ein Jahr; die 5-Jahres-Überlebensrate schwankt in Abhängigkeit vom Tumorstadium zwischen 80 Prozent im Stadium I und weniger als fünf Prozent im Stadium IV. Hochdifferenzierte

Karzinome scheinen, auch mit Metastasierung, eine günstigere Prognose zu haben als niedrig differenzierte.

Einteilung und Wachstum. Zytogenetisch unterscheidet man papilläre Tumoren, die etwa 10% aller menschlichen Nierenzellkarzinome ausmachen, von nicht-papillären Formen. Histologisch unterscheidet man einen klarzelligen Typ (80%) mit meist solidem Wachstum, einen chromophilen Typ (10%) mit häufig papillärer Struktur und einen chromophoben Typ (5%) mit bevorzugt solidem Wachstumsmuster sowie weitere, seltenere Typen.

1.2 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Viele maligne Tumoren weisen eine Überexpression des zellmembranständigen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors EGF-R, wie auch seiner Verwandten ERBB-2, -3 und -4 auf. Für menschliche Nierenzellkarzinome belegen zahlreiche Studien ebenfalls diese Überexpression einheitlich für EGF-R und teilweise auch für ERBB-2. Die Membranständigkeit dieser Rezeptoren macht sie zu einem potentiellen Angriffspunkt für rezeptorbindende Chemotherapeutika. Ein Therapieansatz ist hierbei die Proliferationshemmung maligner Zellen durch sogenannte rekombinante Toxine, die die Fähigkeit besitzen, sich über eine Bindungsdomäne an die extrazellulären Domänen der Zellmembranrezeptoren maligner Zellen zu binden. Nach Internalisation der rekombinanten Toxine wird die Tumorzelle von der toxischen Komponente vernichtet.

In Anbetracht der schlechten chirurgischen Therapiemöglichkeit metastasierter Nierenzellkarzinome, ihrer hohen Strahlenresistenz und bisher nur minimaler Erfolge in der konventionellen Chemotherapie sollte mit der vorliegenden Arbeit in in-vitro-Versuchen die Sensibilität menschlicher Nierenkarzinomzelllinien gegenüber drei neuen rekombinanten Toxinen überprüft werden. Dabei wurde auch die Art des Zellunterganges, die durch die rekombinanten Toxine hervorgerufen wird, untersucht.

Es wurden dafür

- **in-vitro-Expositionsversuche von 21 menschlichen Nierenzellkarzinomlinien gegenüber den drei rekombinanten Toxinen scFv-(FRP5)-ETA, scFv(225)-ETA sowie TGF- α -ETA in jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt; dabei wurde die Wachstumshemmung Toxin-exponierter Zellen in einem standardisierten Zellproliferationsassay (MTT-Test) bestimmt und ausgewertet;**
- **je eine ausgewählte menschliche Nierenzellkarzinomzelllinie vom klarzelligen, chromophilen und chromophoben Typ mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und lichtmikroskopisch betrachtet. Die Art des Zelltodes wurde untersucht, Apoptosen und Mitosen wurden gezählt, statistisch ausgewertet und mit den anderen Testverfahren verglichen;**
- **bei je einer ausgewählten menschlichen Nierenzellkarzinomzelllinie vom klarzelligen, chromophilen und chromophoben Typ die Apoptosehäufigkeiten nach Toxinexposition mittels „Cell death detection-ELISA[®]“ bestimmt;**
- **ERBB-2-Rezeptorstatus ausgewählter Nierenzellkarzinomlinien mittels Westernblot-Analyse bestimmt.**

2 Wachstumsfaktorrezeptoren und ihre Liganden

2.1 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren bilden eine heterogene Gruppe von Polypeptiden, die zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Angiogenese vermitteln (*Wahl et al., 1987a*). Man bezeichnet sie deshalb auch als mitogene Polypeptide. Durch die Bindung an spezifische membranständige Glykoproteinrezeptoren tragen sie Informationen an die Zelle heran und vermitteln die Zellantwort, häufig über rezeptoreigene Tyrosinkinase-Aktivierung mit Phosphorylierung des Rezeptors und Induktion einer intrazellulären Signalkaskade mit Internalisierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes. Viele dieser Signalwege aktivieren letztendlich Transkriptionsfaktoren der Zelle und führen damit zu einer Veränderung ihrer Genexpression.

In vielen Tumoren beobachtet man eine Überexpression von Wachstumsfaktoren, die sich in einem unangemessenen und unregelmäßigen Wachstum des tumorösen Gewebes sowie benachbarter nicht-tumoröser Zellen manifestieren kann und möglicherweise eine bedeutende Rolle in der neoplastischen Transformation von Zellen spielt (*Lyons et al., 1990*). Hierbei können Zellen über einen autokrinen Mechanismus auf eigens von ihnen produzierte und sezernierte Wachstumsfaktoren reagieren oder auf parakrinem bzw. juxtakrinem Weg auf Wirkstoffe reagieren, die von Zellen aus unmittelbarer Nachbarschaft sezerniert worden sind. Bereits im Jahre 1989 wurde auf einen möglichen „autocrine-loop“-Mechanismus zwischen TGF- α und dem EGF-Rezeptor hingewiesen (*Mydlo et al., 1989*).

2.1.1 Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)

EGF ist ein Polypeptid geringen Molekulargewichtes, welches im menschlichen Genom auf Chromosom 4 kodiert wird. Es ist natürlicher Ligand für

den EGF-Rezeptor und beeinflusst das epitheliale Zellwachstum und die epitheliale Differenzierung.

In den letzten Jahren sind mehrere Mitglieder der Familie sogenannter „EGF-ähnlicher Moleküle“ identifiziert worden, die alle die Fähigkeit haben, mit dem EGF-Rezeptor zu interagieren, mitogene Aktivität besitzen und untereinander Sequenzhomologien aufweisen. Zu dieser Familie gehören neben EGF und TGF- α (transforming growth factor alpha) auch Amphiregulin (*Plowman et al., 1990*), „Vaccinia-virus-growth-factor“, „Heparin-binding EGF-like growth factor“, Betacellulin und Epiregulin (*Riese et al., 1998*). Während in Modellsystemen die erstgenannten Faktoren sehr ähnliche Muster der Zellantwort induzieren, bilden Betacellulin sowie die weiter unten angesprochenen Neureguline funktionell ein sehr heterogenes Subsystem (*Riese et al., 1996a*). Neureguline bilden die natürlichen Liganden für die EGF-R-Subtypen erbB-3 und erbB-4. Für ERBB-2 scheint bisher noch kein physiologischer Ligand gefunden worden zu sein (*Gullick et al., 1998; Gulliford et al., 1997*).

2.1.2 TGF- α

TGF- α ist ein 5500 Da großes Polypeptid mit sowohl struktureller als auch funktioneller Verwandtschaft zu EGF. Als Mitglied der Familie EGF-ähnlicher Moleküle vermittelt es seine Wirkung ebenfalls über den EGF-Rezeptor. Es wird auf dem Chromosom 2 codiert.

Nach Rezeptorbindung kommt es zu einer Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinase des EGF-Rezeptors. Am Ende steht die Aktivierung von „Mitose-aktivierenden-Proteinkinasen“ (MAPK), die über die Phosphorylierung von weiteren Proteinen Transkriptionsfaktoren kontrollieren und zu einer Veränderung der Genexpression der Zelle führen.

TGF- α scheint nach Aufnahme in die Zelle sehr schnell in den Endosomen degradiert zu werden, möglicherweise um die schnelle Rückkehr des Rezeptors an die Zelloberfläche zu ermöglichen. Im Gegensatz dazu wird

EGF primär in den späten Lysosomen degradiert, so daß EGF gegenüber TGF- α verlängert intrazellulär resident ist. Möglicherweise spielen diese beiden Vorgänge eine zentrale Rolle in der unterschiedlichen Aktivität der beiden Wachstumsfaktoren (*Hamel et al., 1997*).

Für verschiedene Zelllinien ist eine Überexpression von TGF- α beschrieben worden. Mydlo et al. beobachteten die Expression von TGF- α -mRNA in malignen Nierentumoren, nicht jedoch in den korrespondierenden nicht-neoplastischen Geweben (*Mydlo et al., 1989*). Für Nierenzellkarzinome ist außerdem die Zunahme sowohl von EGF-R-mRNA als auch von TGF- α -mRNA nach Stimulation mit TGF- α beschrieben. Dieser „autocrine-loop“ kann in vitro mit EGF-Rezeptor-Antikörpern durchbrochen werden (*Atlas et al., 1992*). Für die exogene Applikation von TGF- α in Nierenzellkarzinomzellkulturen sind sowohl eine Wachstumsstimulation als auch -inhibition beschrieben (*Ramp et al., 1997*), so daß TGF- α einen höchst komplizierten und heterogenen, modifizierenden Effekt auf das Zellwachstum zu haben scheint.

2.2 Wachstumsfaktorrezeptoren – Die EGF-Rezeptor-Familie

Allgemeines. Der EGF-Rezeptor ist der Prototyp für eine Familie strukturähnlicher Proteine, sogenannte Klasse-I-Rezeptoren, welche alle die Proliferation und Differenzierung normaler und tumoröser Gewebe vermitteln (*Ullrich et al., 1990*). Vier Mitglieder dieser Familie sind bekannt: erbB-1 / EGF-Rezeptor, ERBB-2 / HER-2 / neu-Rezeptor sowie erbB-3- und erbB-4-Rezeptor (*Peles et al., 1993a*).

Typ-I-Rezeptor-Tyrosinkinase der erbB- bzw. EGF-Rezeptorfamilie spielen eine bedeutende Rolle in der Entwicklung von menschlichen Tumoren. Unterschiedliche Studien haben eine Korrelation zwischen Überexpression von Onkogenen und dem biologischen Verhalten von Tumoren und damit verbunden mit der klinischen Prognose dieser Tumoren aufgezeigt.

2.2.1 EGF-Rezeptor (Epidermal-growth-factor-receptor)

Der Epidermale-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R) ist ein aus 1186 Aminosäuren bestehendes, 170 kDa großes transmembranöses Glykoprotein, welches an der Antwort der Zellen auf mitogene Polypeptide der EGF-Familie, wie EGF, TGF- α , Amphiregulin (*Carpenter et al., 1987*) u.a. beteiligt ist und dadurch bedeutenden Einfluß auf Differenzierung und Wachstum der Zelle hat. EGF-R ist in die epitheliale Proliferation im Wundheilungsprozess, aber auch in die Proliferation maligner Tumorzellen einbezogen und wird in nahezu allen Geweben des Erwachsenen, mit Ausnahme der hämatopoetische Zellen, gefunden. EGF-R und ERBB-2 werden beide in normalem Nierengewebe exprimiert (*Stumm et al., 1996*). Beim Menschen wird EGF-R von dem c-erbB-1-Gen auf dem Chromosom 7 codiert.

Aufbau. Der EGF-Rezeptor besteht aus einem extrazellulären, einem membranösen und einem intrazellulären Anteil (*Gadella, Jr. et al., 1995*) und erfüllt somit die Kriterien eines transmembranösen Proteins. Die extrazelluläre Domäne besteht aus 621 Aminosäuren und beinhaltet die EGF-Bindungsstelle zur Interaktion mit seinen Liganden. Ein membranöses Segment aus 23 hydrophoben Aminosäuren mit α -Helix-Struktur verbindet sie mit der intrazellulären Domäne, welche aus 542 Aminosäuren besteht und als funktionelle Einheit eine Tyrosinkinase enthält, die für die Signalweiterleitung durch Autophosphorylierung oder Phosphorylierung von exogenen Substraten verantwortlich ist. Bei vielen Rezeptor-Ligand-Komplexen besteht die einzige Funktion des Liganden darin, mit dem Rezeptor eine Bindung einzugehen und dadurch die Eigenschaften des Rezeptors zu verändern: Der Rezeptor wird aktiviert oder inhibiert.

Nach Ligandenbindung an den extrazellulären Anteil des EGF-R lassen sich prinzipiell folgende Vorgänge unterscheiden, die teilweise gleichzeitig ablaufen:

1. *Dimerisierung*
2. *Internalisierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes*
3. *Phosphorylierung des Rezeptors*
4. *Degradation von Ligand und Rezeptor via lysosomalem Abbauweg*
5. *Signaltransduktion*

Schicksal des Rezeptors. Die Bindung von EGF an seinen Rezeptor induziert die Dimerisation von zwei EGF-Molekülen entlang der Zellmembran mit folgender Autophosphorylierung durch die Tyrosinkinase und Aktivierung des Rezeptors. Der Ligand-Rezeptor-Komplex wird über Endozytosemechanismen in Clathrin-assoziierten „coated-pits“ internalisiert. Gleichzeitig assoziieren die autophosphorylierten EGF-Rezeptoren mit pTyr-bindenden Domänen verschiedener intrazellulärer Signalproteine (*Wang et al., 1996*) und setzen eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang.

Es gibt Hinweise dafür, daß Clathrin-assoziierte Proteinkomplexe und auch sogenannte Adaptoren (APs) diese Formation von EGF-R in „coated pits“ vermitteln. Bisher sind zwei Arten von APs bekannt, wobei AP-1 mit dem Golgi-Apparat und AP-2 mit der Plasmamembran assoziiert zu sein scheint. Der aktivierte EGF-Rezeptor vergesellschaftet sich selektiv mit AP-2 an der Plasmamembran (*Boll et al., 1995*). Letztendlich gelangen die Rezeptoren in die Lysosomen und werden dort abgebaut. Durch die Internalisierung wird also gleichzeitig eine graduelle Abnahme der Rezeptordichte hervorgerufen, welche ihrerseits die EGF-R Signalantwort abschwächt.

Für die Vermittlung dieses lysosomalen Abbauweges sind vermutlich zwei Regionen des EGF-R-Moleküls verantwortlich, AS 1022-1063 und AS 1063-1123. Eine weitere Rolle in der Rekrutierung von aktiviertem EGF-R in „coated pits“ scheint auch Eps15, ein Substrat der EGF-Rezeptortyrosinkinase, zu spielen (*van-Delft et al., 1997*). Eps15 bindet an

die α -Untereinheit von AP-2 (Benmerah et al., 1995). Die carboxyterminale, regulative Domäne von EGF-R ist für die Endozytose und für die Interaktion mit dem Clathrin-assoziierten Proteinkomplex AP-2 essentiell. Die hochaffine Bindungsstelle an AP-2 wird an Position Tyr974 von EGF-R vermutet. EGF-Rezeptor-Mutanten, die nicht an AP-2 binden, weisen bei hoher Expression eine niedrigere Rate an Internalisation, „Down-Regulation“ und Rezeptorumsatz, verglichen mit dem Wildtyp-Rezeptor, auf. Bei niedriger Expressionsrate wurden sie internalisiert und herunterreguliert wie Wildtyp-Rezeptoren (Sorkin et al., 1996).

Eine entscheidende Rolle bei der Wachstumsregulation von Tumorzellen scheint auch der Rezeptorumsatz zu spielen: In Versuchen an der menschlichen Zelllinie A431 war die Umsatzrate von EGF am EGF-Rezeptor abhängig von der Wachstumsdichte der Zellkultur. Mit steigender Zelldichte nahm die Internalisierungsrate ab; gleichzeitig nahm jedoch die Affinität des einzelnen Rezeptors zu (Sunada et al., 1991).

Signaltransduktion. Für die Signalweiterleitung über den EGF-Rezeptor ist die enzymatische Aktivität der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne des EGF-Rezeptors essentiell: Der durch Liganden aktivierte EGF-Rezeptor (Dimerisation, s.o.) phosphoryliert Tyrosinresiduen an seinem C-terminalen Ende (Li et al., 1991). Diese Phosphorylierungsereignisse setzen eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang, welche weitere Ereignisse, wie z.B. die Transkription von Genen, aktiviert. Für den EGF-Rezeptor wird nach Stimulation durch seinen Liganden EGF die Bereitstellung von Inositolphosphat als intrazelluläres „Second-messenger“-Molekül sowie konsekutivem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle beschrieben (Li et al., 1991). Am Ende dieser Signalkaskade steht die DNA-Synthese (Moolenaar et al., 1988). Möglicherweise ist an der Induktion der Inositolphosphatmoleküle auch erbB-3 mitbeteiligt, welches in in-vitro Versuchen ebenfalls Antworten auf Stimulation mit EGF hervorrufen konnte (Soltoff et al., 1994). Die

Signaltransduktionsproteine interagieren physikalisch via SH-2-Domänen mit dem autophosphorylierten Rezeptor (*Gadella, Jr. et al., 1995*).

Rolle von EGF-R in Tumoren. Zahlreiche Studien weisen auf eine Korrelation zwischen Expressionsausmaß des EGF-Rezeptors in Karzinomen unterschiedlicher Organe und deren biologischen und klinischen Verhalten hin: Eine Überexpression des EGF-Rezeptors ist in verschiedenen Karzinomen mit kürzeren Überlebenszeiten der Patienten assoziiert (*Veale et al., 1993*). Die Genamplifikation und Überexpression des normalen EGF-Rezeptors geht mit höherer Invasivität von Harnblasenkarzinomen einher (*Neal et al., 1985*), in kolorektalen Karzinomen besteht eine hohe Korrelation zwischen EGF-R-Überexpression und Metastasierung (*Radinsky et al., 1995*). Ferner zeigt sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen erhöhtem EGF-Rezeptorstatus und höherem Tumorgrad; im klinischen Follow-up von Patienten mit Nierenzellkarzinomen wurde bei Tumoren, die Fernmetastasen aufwiesen, eine höhere EGF-R-Expression beobachtet als bei nicht-metastasierten Tumoren (*Stumm et al., 1996*). Auch beobachtete man eine Assoziation von erhöhter EGF-Rezeptor-Expression und Tumorzellproliferation mit kürzerer Überlebenszeit bei Patienten mit nicht-papillären pT₃-Nierenzellkarzinomen (*Moch et al., 1997*).

Die Überexpression von EGF-R scheint somit mit einer klinisch schlechteren Prognose korreliert zu sein. Im Gegensatz dazu konnte in follow-up-Studien bezüglich der Überlebenszeit sowie Remissionsdauer bei Patienten mit lokoregionalen Nierenzellkarzinomen keine Abhängigkeit von einem der untersuchten Wachstumsfaktoren (EGF, TGF- α) oder der Rezeptorexpression (EGF-R, ERBB-2), sondern lediglich eine Abhängigkeit vom Tumorstadium und Malignitätsgrad festgestellt werden. Auch die Koexpression der Wachstumsfaktoren wies keine prognostische Relevanz auf (*Hofmockel et al., 1997*).

2.2.2 ERBB-2-Rezeptor

Das menschliche erbB2-Gen codiert das 185 kDa große transmembranöse Glykoprotein p185^{c-neu} oder auch ERBB-2 (*Qian et al., 1994*).

p185^{ERBB-2/neu} wurde 1984 ursprünglich als Produkt eines Transformationsgens von Neuroblastomen bei Ratten entdeckt und wies eine Homologie mit dem EGF-Rezeptor auf, was die Suche nach einem Liganden, der eine Autophosphorylierung von p185 stimuliert, entfachte. 1992 berichteten zwei Forschungsgruppen von einem möglichen Liganden, einem 44 kDa großen Protein, genannt Heregulin- α (HRG- α) (*Holmes et al., 1992*) oder auch neu differentiation factor (NDF), welcher die Tyrosinphosphorylierung von p185 in einigen Mammakarzinomen induzierte. Dennoch scheint bis heute der natürliche Ligand von ERBB-2 noch nicht gefunden worden zu sein. ERBB-2 wird in normalem Nierengewebe exprimiert (*Stumm et al., 1996*).

Vorkommen in Tumoren. 30 bis 40 Prozent aller Brust- und Ovarialkarzinome weisen eine Überexpression des HER-2/neu-Onkogens auf (*Brossart et al., 1998*). In Mammakarzinomen sind Amplifikation und Überexpression von HER-2/neu mit schlechter klinischer Prognose und hoher Tumoraggressivität assoziiert (*Gullick et al., 1990*); ERBB-2-Überexpression und schlechte klinische Prognose korrelieren auch in Tumoren des Ovars (*Slamon et al., 1989*) und der Lunge (*Kern et al., 1990*).

2.2.3 Rezeptorinteraktionen durch Heterodimerisierung

Das Vorhandensein von p180^{erbB3} oder p180^{erbB4} ist für die Heregulin / NDF-stimulierte Tyrosinphosphorylierung von p185^{ERBB-2/neu} notwendig (*Carraway III et al., 1994 a; Carraway et al., 1995 a/b; Chan et al., 1995; Sliwkowski et al., 1994*).

Homodimerisation. Die Bindung von EGF an seinen Rezeptor führt zu seiner Dimerisation, d.h. es kommt zu der Kopplung von zwei EGF-Molekülen (*Earp et al., 1995; Lemmon et al., 1997*) und intrazellulärer Aktivierung der Kinasedomäne (*Groenen et al., 1997; Spivak et al., 1992*). Die Aktivierung der EGF-R-Tyrosinkinase ist eng an die EGF-Rezeptor-Dimerisation gekoppelt (*Spaargaren et al., 1991*).

Heterodimerisation. Zusätzlich zur Ausbildung sogenannter Homodimere, d.h. der Kopplung von zwei gleichen Molekülen, wird die Formierung von Ligand-induzierten Heterodimeren eines EGF-Rezeptors mit ERBB-2 (*Goldman et al., 1990; Wada et al., 1990*) oder erbB-3 (*Soltoff et al., 1994*), wie auch von ERBB-2 mit erbB-3 oder erbB-4 (*Plowman et al., 1993 a/b; Sliwkowski et al., 1994*) beschrieben.

Trotz fehlender meßbarer Affinität von EGF gegenüber dem ERBB-2-Rezeptor beobachtet man bei Behandlung von Zellen, welche sowohl EGF-R als auch ERBB-2-Rezeptoren aufweisen, eine EGF-stimulierte Tyrosinphosphorylierung von p185: Dies erklärt man durch die o.g. Ligand-induzierte Rezeptorheterodimerisation und gegenseitige Phosphorylierung („cross-phosphorylation“) der Rezeptoren innerhalb eines Heterodimers (*Wada et al., 1990*).

Außerdem kann EGF in hohen Konzentrationen in Abwesenheit von EGF-R über die Koppelung an dem Heterodimer zwischen ERBB-2 und ErbB-3 Zellwachstum und Differenzierung vermitteln (*Pinkas et al., 1998*), obwohl EGF über die entsprechenden Homodimere weder von ERBB-2 noch erbB-3 eine Signalweiterleitung vermitteln kann. Für diese Funktion scheint die mittlere Funktionsdomäne von EGF („loop B“) verantwortlich zu sein (*Pinkas et al., 1998*). Im Gegensatz zu TGF- α kann EGF scheinbar die Heterodimerisation von aktiviertem EGF-R und phosphoryliertem ERBB-2 induzieren (*Gulliford et al., 1997*).

ErbB-2 scheint der bevorzugte Partner für Heterodimere zu sein (*Pinkas et al., 1998*): NDF-aktivierte erbB-3- oder erbB-4-Rezeptoren heterodimerisieren nur mit EGF-R, falls kein ERBB-2 verfügbar ist (*Graus et al., 1997*). Der Mechanismus der Heterodimerisation als solcher weist ein komplexes Zusammenspiel gegenseitiger Wechselwirkungen von Rezeptoren der erbB-Familie auf; verschiedene Modelle werden dafür diskutiert (*Tzahar et al., 1997*). Ein anderes Mitglied der EGF-Familie, Epiregulin, stimuliert z.B. Homodimere sowohl von EGF-R als auch von erbB-4, außerdem aktiviert es alle möglichen Heterodimere aus erbB-Komplexen (*Shelly et al., 1998*).

3 Antikörpertoxine

Seit vielen Jahren beschäftigt man sich in der Tumorforschung mit der Entwicklung zytotoxischer Substanzen, die zwischen gesunden und malignen Zellen unterscheiden und selektiv letztere schädigen und vernichten können. Diesem Gedanken kam man mit der Entwicklung spezifischer Antikörper gegen zellmembrangebundene Rezeptoren einen Schritt näher. Diese Antikörper hatten die Potenz, für das Zellwachstum wichtige Zellmembranrezeptoren zu blockieren und dadurch in einigen Fällen das Tumorzellwachstum durch kompetitive Verdrängung von Wachstumsfaktoren an ihren Rezeptoren zu hemmen. Während eine relativ hohe Spezifität für bestimmte Rezeptoren mit der Einführung monoklonaler Antikörper (MAb) erreicht werden konnte, wurde die erhoffte Selektivität der Antikörper zwischen tumorösem und gesundem Gewebe nicht erreicht. Diese scheiterte an der Tatsache, daß bisher keine konstant auftretenden tumorspezifischen Rezeptoren oder Rezeptormutationen gefunden werden konnten. Außerdem exprimieren häufig histologisch gleiche Tumoren unterschiedliche Oberflächenrezeptoren und können deshalb von den Antikörpern nicht durchgehend erkannt werden.

Unter diesem Aspekt fokussierten sich die Untersuchungen auf quantitative Unterschiede zwischen gesundem und tumorösem Gewebe in Bezug auf Rezeptoranzahl, -dichte, Expression von Wachstumsfaktoren uvm.. Sie fanden Konsens in zahlreichen Studien, die eine Überexpression besonders von Wachstumsfaktoren und -rezeptoren an der Zelloberfläche maligner Zellen beobachteten und diese als potentielle Ziele für eine wachstumshemmende Therapie durch Antikörper ansahen.

Antikörpertoxine. Eine Weiterentwicklung einfacher Rezeptorantikörper waren sogenannte Antikörpertoxine oder auch Immunotoxine, die sich aus einem rezeptorbindenden Antikörper und einem Toxin zusammensetzen. Die erste Generation dieser Antikörpertoxine waren einfache Konjugate

monoklonaler Antikörper, meistens IgG, mit Toxinen wie Ricin, Diphtheria-toxin oder Pseudomonas-Exotoxin. Später gelang es, durch limitierte Proteolyse mittels Pepsin bivalente Fab'-2-Fragmente, zusammengehalten von Disulfidbrückenbindungen, zu konstruieren und diese anschließend in 2 Fab mit je einer freien SH-Bindungsstelle zu reduzieren (*Brinkmann et al., 1994*).

Inzwischen werden stabile Fv-Fragmente mittels rekombinanter DNA-Techniken hergestellt: Ein Fv-Fragment ist die kleinste Einheit eines Antikörpers, die eine Bindung zu einem spezifischem Antigen vermitteln kann. Diese Fv-Fragmente konnten nicht durch einfache Proteolyse aus monoklonalen Antikörpern gewonnen werden, da sie instabil wären. Durch Rekombination war es jedoch möglich, stabile Fv-Fragmente in bakteriellen Expressionssystemen herzustellen, die durch Linkerpeptide (sc(Fv)) oder Disulfidbrücken (ds(Fv)) stabilisiert werden (*Brinkmann et al., 1993; Reiter et al., 1994 a-d; 1995, 1996*). Diese stabilen Fv-Fragmente wurden an ihrem freien Ende an bakterielle Toxine wie Ricin, Pseudomonas-Exotoxin-A oder Diphtheria-Toxin gekoppelt; es entstanden sogenannte Antikörpertoxine mit zwei wesentlichen Funktionseinheiten: einer rezeptorbindenden und einer toxischen Domäne (*Hertler et al., 1989*).

3.1 *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A

Das ubiquitär vorkommende gramnegative aerobe Stäbchenbakterium *Pseudomonas aeruginosa* bildet neben seinen Endotoxinen das Exotoxin A (ETA). Beim Menschen verursacht es u.a. eine Sepsis und eine Pneumonie.

Toxizität. Bei in-vitro-Versuchen an menschlichen Monoblastenzelllinien führte ETA zu morphologischen Apoptosecharakteristika und schließlich zum Zelltod (*Kochi et al., 1993*). An verschiedene menschliche Interleukine (IL-4, IL-13) gekoppeltes *Pseudomonas*-Exotoxin war für einige menschliche Nierenzellkarzinomlinien stark zytotoxisch (*Puri et al., 1994*;

Puri et al., 1996). Auch Mizutani et al. beobachteten eine Sensitivität von RCC-Linien gegenüber ETA (*Mizutani et al., 1994*). Die intraperitoneale Injektion von *Pseudomonas aeruginosa* führte bei Mäusen über den Weg der Apoptose zu einer Thymusatrophie (*Wang et al., 1994*).

Aufbau und Funktionseinheiten. *Pseudomonas-aeruginosa*-Exotoxin-A (ETA) setzt sich aus drei Domänen unterschiedlicher Funktion zusammen, wobei die Domäne I am NH₃-Ende des ETA-Gens für die Bindung an den α_2 -Makroglobulin-Rezeptor verantwortlich (*Mucci et al., 1995*) und für seine enzymatische Aktivität nicht notwendig ist (*Siegall et al., 1989a*); die Domäne II realisiert die Translokation in das Zellzytosol. Die eigentliche enzymatische Aktivität geht von Domäne III aus, die den Transfer einer ADP-Ribosegruppe von NAD⁺ als Donor auf einen modifizierten Histidinrest (Diphthamid) des Elongationfaktor-2 (EF-2) katalysiert (*Li et al., 1995*). Die ADP-Ribosylierung von EF-2 führt letztendlich zu einer Inhibition der Zellproteinsynthese und schließlich zum Zelltod.

Eine Substitution der Domäne I durch bestimmte Liganden kann dazu benutzt werden, andere Zellmembranrezeptoren zu erkennen und an diese zu binden. Für die Konstruktion der im folgenden vorgestellten rekombinanten Toxine durch Herrn Dr. Wells aus Freiburg wurde diese Domäne I aus ETA deletiert.

3.2 scFv(FRP5)-ETA

Bindungsdomäne. Mittels rekombinanter DNA-Techniken war es möglich, ein Gen zu klonen und zu exprimieren, welches die scFv-Domäne des ERBB-2 spezifischen monoklonalen Antikörpers FRP5 kodiert (*Harwerth et al., 1992*).

Toxische Domäne. Mit dem Ziel, ein zytotoxisches Agens herzustellen, wurde diese scFv-kodierende Sequenz an ein um seine Bindungsdomäne I gekürztes ETA-Gen gekoppelt, welches noch die Translokationsdomäne

II und die ADP-ribosylierende Domäne III kodiert (Aminosäuren 252 bis 613 des Wildtyp-ETA). Das fusionierte Gen wurde in den Expressionsvektor pFLAG-1 3' eines ompA Signalpeptides eingesetzt. Es resultierte das Plasmid pWW215-5,scFv(FRP5)-ETA, welches unter der Kontrolle eines IPTG induzierbaren tac-Promotors in einem E.-coli-Stamm exprimiert wurde. Die Größe des exprimierten scFv(FRP5)-ETA Proteins beträgt M_r 66.000 (Wels et al., 1992 a).

Affinität. Die Bindungsaffinitäten sowohl von scFv(FRP5) als auch von scFv(FRP5)-ETA sind bis zu 8 mal niedriger als die des monoklonalen Antikörpers MAb FRP5, was dafür spricht, daß nicht das ETA, sondern die scFv(FRP5)-Domäne selbst für die Affinitätsverminderung verantwortlich ist.

Spezifität. scFv(FRP5)-ETA hemmte selektiv die Proteinsynthese in HC11-Zellen, die mit menschlichen ERBB-2-Expressionsvektoren transfiziert worden sind, während in nicht-transfizierten HC11-Zellen keine Proteinsynthesehemmung beobachtet werden konnte (Wels et al., 1992 a/b).

Zytotoxizität. scFv(FRP5)-ETA induziert mit hoher Aktivität die Bindung einer ADP-Ribosegruppe an das Diphthamid des Elongationsfaktor-2. Im Vergleich zu der Aktivität des Antikörper-Alkalische-Phosphatase-Komplexes scFv-(FRP5)-PhoA induziert scFv(FRP5)-ETA eine etwa 40-fach höhere Ribosylierung (Wels et al., 1992 a). Monoklonale Antikörper (Mabs) zeigten keinen zytotoxischen Effekt bei mit menschlichen ERBB-2-Expressionsvektoren transfizierten HC11-Zellen, während scFv(FRP5)-ETA zellwachstumshemmend wirkte. Bei Kombination von MAbs und scFv(FRP5)-ETA wird der toxische Effekt von scFv(FRP5)-ETA vermutlich durch Konkurrenz mit den MAbs am Rezeptor gemindert. Diese Beobachtungen legen nahe, daß die Internalisierung der Toxine tatsächlich

spezifisch über eine Rezeptorbindung und nicht über andere Mechanismen, wie z.B. per diffusionem o.ä., vermittelt wird.

Andere Untersuchungen an Mäusen belegen die Wirksamkeit von scFv(FRP5)-ETA an ERBB-2-Rezeptor-positiven Tumoren in vivo: Die Transplantation ERBB-2-Rezeptor-positiver Nierenzellkarzinomzellen in Mäuse führte zur Bildung pulmonaler Metastasen. Die systemische Applikation von scFv(FRP5)-ETA ab einem Tag nach Tumorzelltransplantation über eine Periode von 10 Tagen verhinderte die Ausbildung pulmonaler Metastasen. Eine Behandlung der Mäusen ab dem 11. Tag nach Tumorzelltransplantation, nachdem sich bereits pulmonale Filiae ausgebildet hatten, führte zu drastischer Reduktion von Metastasengröße und -anzahl (Maurer et al., 1998).

In Ratten konnten subkutan wachsende ERBB-2-exprimierende Schwannome sowohl durch intratumorale Injektion als auch durch systemische Applikation von 25µg scFv(FRP5)-ETA pro Tag über 10 Tage in ihrem Wachstum effektiv gehemmt werden (Altenschmidt et al., 1997).

Pharmakokinetik. Die in-vivo-Serumhalbwertszeit von scFv(FRP5)-ETA bei Mäusen beträgt etwa 30 Minuten (Wels et al., 1992 a).

3.3 scFv(225)-ETA

MAB 225 ist ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch an den EGF-Rezeptor bindet. MAB 225 kompetiert mit EGF um die Bindung an dem EGF-Rezeptor (Fan et al., 1993). Eine Behandlung mit MAB 225 hemmt das Wachstum von Tumorzellen in vitro wie auch in vivo (Wels et al., 1995).

Konstruktion. Die Konstruktion von scFv(225)-ETA erfolgte korrespondierend zu der von scFv(FRP5)-ETA: In einem pFLAG-1-Expressionsvektor wurde ein Gen konstruiert, das für ein Protein kodiert, welches aus dem scFv-Anteil des EGF-Rezeptor-spezifischen MAB 225 (Sunada et al.,

1986) sowie den Domänen Ib, II und III des Pseudomonas-Exotoxins-A, besteht (Wels et al., 1995).

Bindungsaffinität. Die Bindungsaffinität des monovalenten rekombinanten Proteins ist etwa 2 mal niedriger als die des monovalenten Fab´ Fragments (Fan et al., 1993) und etwa 10-fach niedriger als die des bivalenten MAb (Wels et al., 1995).

Spezifität. scFv(225)-ETA bindet spezifisch an den EGF-Rezeptor.

Zytotoxizität. Die Zytotoxizität von scFv(225)-ETA liegt um ein Vielfaches höher als die des monoklonalen Antikörpers MAb 225. Die Antikörperdomäne im scFv(225)-ETA führt nicht zu einer Rezeptoraktivierung, selbst wenn die toxische Domäne z.B. durch proteolytische Degradation inaktiviert werden würde (Wels et al., 1995), sondern hemmt durch kompetitive Bindung die Rezeptoraktivierung.

3.4 TGF- α -ETA

TGF- α -ETA ist ein zusammengesetztes Molekül aus TGF- α , dem natürlichen Liganden des EGF-Rezeptors, und dem um seine Bindungsdomäne gekürzten Pseudomonas-Exotoxin A (Chaudhary et al., 1987). Im Gegensatz zu scFv(FRP5)-ETA und scFv(225)-ETA ist TGF- α -ETA somit kein Immunotoxin. Als natürlicher Ligand kann TGF- α -ETA (im Gegensatz zu scFv(225)-ETA) den EGF-Rezeptor aktivieren (Siegall et al., 1989).

Tabelle 3-1 gibt einen Überblick über die bekannten Eigenschaften der untersuchten rekombinanten Toxine:

Rekombinantes Toxin	scFv(FRP5)-ETA	scFv(225)-ETA	TGF-α-ETA
Rezeptor	<i>ERBB-2</i>	<i>EGF-R</i>	<i>EGF-R</i>
Rezeptorbindende Domäne	scFv	scFv	TGF- α
Rezeptoraktivierung	*	nein	ja
Induktion	Bindung einer ADP-Ribosegruppe an den Elongationfaktor-2		
Zytotoxizität des korrespond. monoklonalen Antikörpers (Mab)	nein	ja	kein korresp. Mab; TGF- α ist natürlicher Ligand

Tabelle 3-1. Überblick über die Eigenschaften der verwendeten rekombinanten Toxine. (*) Eine Rezeptoraktivierung ist für scFv(FRP5)-ETA nicht gesichert.

4 Formen des Zelltodes: Apoptose und Nekrose

Anhand morphologischer und biochemischer Kriterien können zwei Entitäten eukaryontischen Zelltodes beschrieben werden: Nekrose und Apoptose. Die Nekrose ist durch Zellödem, Schädigung der Membranintegrität sowie das Freisetzen von zytosolischen Enzymen gekennzeichnet. Eine Chromatinkondensation wird nicht beobachtet.

Die Apoptose ist dagegen ein Weg des zellulären Todes, der vermutlich als physiologischer Schutz zur Beibehaltung einer Zellhomöostase dient. Die Apoptose kann während der embryonalen Gewebeentwicklung, in normalem Wechselgewebe und bei der Involution von Organen beobachtet werden, wie z.B. bei der Thymus- oder der Mammainvolution. Beobachtet wurde die Apoptose z.B. auch in der Prostata kastrierter Ratten. Bei der Apoptose kommt es zu einer Kondensation des Chromatins sowie DNA-Fragmentation und schließlich zu einer Aktivierung endogener Nukleasen (*Weisser et al., 1998*). Diese spalten doppelsträngige DNA an den internukleosomalen Linker-Regionen, wodurch es zur Bildung von Mono- und Oligonukleosomen kommt. Die DNA der Nukleosomen selbst hingegen ist über Komplexe fest an Träger-Histone gekettet und wird dadurch vor der Spaltung durch die Endonukleasen geschützt. Die Apoptose lässt sich lichtmikroskopisch mittels spezieller Apoptosefärbungen, aber auch mittels ELISA über den Nachweis von Oligonukleosomen bzw. DNA-Fragmenten oder direkt auf DNA-Ebene über die Darstellung einer sogenannten „DNA-Ladder“ nachweisen.

5 Material und Methoden

5.1 Zelllinien und Zellkultur

Für die Untersuchungen wurden 21 neu etablierte humane Nierenzellkarzinomlinien herangezogen. 15 waren vom klarzelligen (clearCa-1 bis -15) (Gerharz *et al.*, 1994), 4 vom chromophilen (chromphi-1 bis -4) (Gerharz *et al.*, 1996) und 2 vom chromophoben (chrompho-A und -B) Typ (Gerharz *et al.*, 1995). Tabelle 5-1 zeigt eine Aufstellung der verwendeten Nierenzellkarzinomlinien mit Staging nach der TNM-Klassifikation und Differenzierungsgrad des Primärtumors sowie Alter und Geschlecht des Patienten. Als Referenzzelllinie für eine Vergleichbarkeit mit in der Literatur beschriebenen Ergebnissen wurde die Zelllinie A431 herangezogen, die sich von einem Plattenepithelkarzinom der Vulva ableitet.

Für die Versuche wurden Zelllinien der Passagen 30 bis 90 verwendet. Die Zellen wurden in DMEM[®] (Dulbecco's modified Eagle's medium; Fa. Gibco) unter Zusatz von 1% Penicillin, 1% Streptomycin und 10% FCS (fetales Kälberserum) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

	ALTER; GESCHLECHT	STAGING	GRADING
KLARZELLIGE RCC			
clearCa -1	67; m	pT3a	G 2
-2	51; m	pT3a	G 3
-3	66; w	pT3a	G 2
-4	75; w	pT2	G 1
-5	69; w	pT3b	G 3
-6	59; m	pT3b	G 3
-7	53; m	pT2	G 3
-8	67; m	pT3b	G 2
-9	59; w	pT2	G 1
-10	44; w	pT3b	G 2
-11	59; w	pT2	G 2
-12	60; m	pT3a	G 2
-13	73; w	pT2	G 2
-14	55; m	pT3b	G 3
-15	60; m	pT3a	G 2
CHROMOPHILZELLIGE RCC			
chromphi -1	64; m	pT3b	G 3
-2	63; m	pT3a	G 2
-3	64; m	pT2	G 2
-4	71; m	pT2	G 1
CHROMOPHOBZELLIGE RCC			
chrompho -A	82; w	pT3a	G 2
-B	82; w	pT3a	G 3
REFERENZ			
A431			

Tabelle 5-1. Etablierte Nierenzellkarzinomzelllinien. Aufgeführt sind Bezeichnung der Zelllinie mit pTNM-Stadium und Differenzierungsgrad des Primärtumors sowie Alter und Geschlecht des Patienten.

5.2 MTT-Test

Mittels MTT-Test wurde die Sensibilität von 21 humanen Nierenzellkarzinomlinien gegenüber den oben beschriebenen Antikörpertoxinen scFv-(FRP5)-ETA, scFv(225)-ETA und TGF- α -ETA in vitro untersucht. Als Maß dafür wurde die Zellwachstumshemmung Toxin-exponierter Zellen in Relation zu nicht-exponierten Zellen benutzt.

Testprinzip. Der MTT-Test dient der quantitativen Bestimmung der Zellvitalität und wurde erstmals 1983 von Mosmann beschrieben. Das gelbe wasserlösliche Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) wird dabei nur von vitalen Zellen enzymatisch zu seinem blauen wasserunlöslichen Formazan reduziert. Das wasserunlösliche Formazan wird in DMSO gelöst und die Farbextinktion photometrisch mit einem ELISA-Reader gemessen.

Präparation und Aussaat der Zellen (Zeitpunkt $t = -24 h$). Die nahezu konfluenten Zellen wurden mittels 0,05% EDTA aus den Kulturflaschen gelöst, mit 10% FCS-haltigem Kulturmedium verdünnt und durch vorsichtiges Mischen in Einzelzellsuspension gebracht. Danach erfolgte die Zellzählung eines Aliquots mit anschließender Verdünnung der Zellsuspension in Kulturmedium auf eine Konzentration von 100.000 lebenden Zellen (LZ) pro Milliliter.

Je 10.000 LZ / 100 μ l Medium / Well wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät (8-fach-Bestimmung). In 8 Wells wurde als Leerwert jeweils nur 100 μ l Medium ohne Zellen pipettiert. Die Mikrotiterplatten wurden für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Toxinapplikation ($t = 0$). Nach 24 Stunden wurden den Zellen 100 μ l Kulturmedium (Kontrolle) bzw. rekombinante Toxine in den Endkonzentrationen 10 bzw. 100 ng/ml (exponierte Zellen) hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂.

Abbruch ($t = +48 \text{ h}$). Nach 48 Stunden wurden die Zellen in den Mikrotiterplatten zur groben Einschätzung eines proliferationshemmenden Effektes und der Zellmorphologie lichtmikroskopisch betrachtet. Jedem Well wurden 50 μl MTT hinzugefügt. Die Mikrotiterplatten wurden anschließend für 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die durch die metabolische Aktivität vitaler Zellen gebildeten Formazanpräzipitate am Boden der Mikrotiterplatten wurden anschließend nach vorsichtigem Dekantieren des Überstandes in je 150 μl DMSO pro Well gelöst und 10 Minuten lang geschüttelt.

Anschließend wurden die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 570 nm mit einem ELISA-Photoreader gemessen. Es erfolgte die Bestimmung der Extinktionen unbehandelter (Kontrolle) und Toxin-exponierter Zellen sowie der Extinktionen des Kulturmediums als Leerwert. Tabelle 5-2 gibt den zeitlichen Versuchsablauf wieder.

Zeitpunkt t	-24 h	0	+48 h	+52 h
	Aussaat	Toxin- Applikation	MTT- Zugabe	DMSO-Applikation und Messung nach 10 min

Tabelle 5-2. Zeitlicher Versuchsablauf des MTT-Tests.

Statistische Auswertung. Von allen Meßwerten wurden durch Subtraktion des Leerwertes sogenannte „korrigierte Meßwerte“ errechnet. Die Mittelwerte der korrigierten Meßwerte eines Versuches wurden aus 8 Replikaten ermittelt. Der prozentuelle Anteil exponierter vitaler Zellen zu nicht-exponierten vitalen Zellen (Kontrolle) ergibt sich aus folgender Formel:

$$P_v = \frac{\text{Extinktionmittel}_{\text{exponiert}} - \text{Extinktionmittel}_{\text{Leerwert}}}{\text{Extinktionmittel}_{\text{Kontrolle}} - \text{Extinktionmittel}_{\text{Leerwert}}} \cdot 100$$

In drei gleichen, unabhängigen Versuchen wurden $Pv_{1,2,3}$ bestimmt und der Mittelwert $M(Pv_{1,2,3})$ sowie die Standardabweichungen ermittelt. Die Zellwachstumshemmung Pt in Prozent ergibt sich wie folgt:

$$Pt_{v_{1,2,3}} = 100 - M(Pv_{1,2,3})$$

Die errechnete Reduktion der Zellzahl wurde für alle untersuchten Zelllinien und Toxinkonzentrationen mittels Student's T-Test auf Signifikanz mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ überprüft.

5.3 Histologie und Hämatoxylin-Eosin-Färbungen

Anhand histochemischer Färbungen auf modifizierten Objektträgern, sogenannten Chamber-slides[®] (Fa. Falcon), wurde die Wirkung von 100 ng/ml scFv(FRP5)-ETA, scFv(225)-ETA bzw. TGF- α -ETA auf je eine ausgesuchte Nierenzellkarzinomlinie vom klarzelligen (clearCa-2), chromophilen (chromphi-1) bzw. chromophoben (chrompho-B) Typ untersucht. Zell- und Zellkernmorphologie wurden lichtmikroskopisch untersucht. Insgesamt wurden pro untersuchte Zelllinie und rekombinantes Toxin 2000 Zellen ausgezählt; dabei wurden Apoptosen und Mitosen getrennt aufgeführt.

Aussaat ($t = -x$). Die in DMEM[®] kultivierten Zellen wurden mit 0,05% EDTA aus den Kulturflaschen gelöst und durch vorsichtiges Mischen mit Kulturmedium in Einzelzellsuspension gebracht. Nach Zellzählung eines Aliquots von 50 μ l wurde eine Zellsuspension mit einer Zellkonzentration von 20.000 LZ / 400 μ l Kulturmedium hergestellt. Es wurden 20.000 LZ / 400 μ l / Well in die Chamber-slides[®] ausgesät und solange inkubiert, bis sich ein konfluenter Zellrasen auf dem Boden der Chamber-slides[®] ausgebildet

hatte. Die unterschiedlich langen Inkubationszeiten für die einzelnen Zelllinien gehen aus Tabelle 5-3 hervor.

	Aussaat	Toxinapplikation	HE-Färbung
clearCa-2	t = -5 d	t = 0	t = +2 d
chromphi-1	t = -5 d		
chrompho-B	t = - 11 d		

Tabelle 5-3. Zeitlicher Versuchsablauf der HE-Färbungen. Die Inkubationszeiten für die untersuchten Zelllinien, bis die Böden der Objektträger konfluent bewachsen waren, sind der Spalte „Aussaat“ zu entnehmen.

Toxinapplikation (t = 0). Der Überstand der Chamber-Slides® wurde vorsichtig dekantiert, danach wurden je 400µl Kulturmedium (Kontrolle), 100 ng/ml scFv(FRP5)-ETA, scFv(225)-ETA bzw. TGF- α -ETA hinzugefügt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 48 Stunden bei 5% CO₂ und 37°C.

Abbruch (t = +2 d). Am Abbruchttag wurden die Fixierungsrahmen von den Chamber-slides® abgelöst. Die Objektträger wurden kurz in 0,9%ige Kochsalzlösung eingetaucht; anschließend erfolgte die Fixation für 5 Minuten in eisgekühltem Methanol und für 30 Sekunden in eisgekühltem Aceton. Die fixierten Zellen trockneten danach bei Raumtemperatur und wurden anschließend mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

5.4 Cell death detection ELISA^{PLUS}®

An je einer klarzelligen (clearCa-2), chromophilen (chromphi-1) und chromophoben (chrompho-B) Nierenzellkarzinomzelllinie sollte die Induzierbarkeit von Apoptose durch die rekombinanten Toxine scFv(FRP5)-ETA,

scFv(225)-ETA und TGF- α -ETA untersucht werden. Verwendet wurde dafür ein kommerziell erhältlicher ELISA („Cell death detection ELISA^{PLUS®}“) der Firma Boehringer Mannheim.

Testprinzip. Der „Cell death detection ELISA^{PLUS®}“ basiert auf einem quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay-Prinzip, bei dem monoklonale Mausantikörper gegen zelluläre DNA und Histone gerichtet sind. Die bei der Apoptose entstehenden Mono- und Oligonukleosomen lassen sich in der zytoplasmatischen Fraktion von Zellysaten bestimmen.

Das zu untersuchende Zellysat wird in eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend werden Anti-Histon-Biotin und Anti-DNA-Peroxidase (Anti-DNA-POD) hinzugegeben und miteinander inkubiert. In der Inkubationszeit kann der Anti-Histon-Antikörper an die Histonkomponente der Nukleosomen binden und gleichzeitig den entstandenen Immunkomplex durch Biotinylierung an die mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte fixieren. Der Anti-Histon-Antikörper bindet an die Histone H1, H2A, H2B, H3 und H4 verschiedener Spezies. Gleichzeitig reagiert der Anti-DNA-Peroxidase-Antikörper mit der DNA-Komponente der Nukleosomen. Er bindet an einzel- und doppelsträngige DNA.

Nach dem Waschen kann die Menge der gebundenen Peroxidase und somit indirekt die Menge gebundener Nukleosomen durch Umsatz mit einem geeigneten Substrat, hier ABTS[®] (2,2'-Azino-di[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat]), spektralphotometrisch bestimmt werden (*Fa. Boehringer Mannheim*).

Durch photometrische Messung und Vergleich der Extinktionen Toxin-exponierter zu nicht-exponierten Zellen (Kontrolle) wurde der Enrichmentfaktor (EF_{ELISA}) ermittelt:

$$EF_{ELISA} = \frac{\overline{E}_{\text{exponiert}} - \overline{E}_{\text{Leerwert}}}{\overline{E}_{\text{Kontrolle}} - \overline{E}_{\text{Leerwert}}}$$

E bezeichnet dabei den Extinktionsmittelwert einer Doppelbestimmung.

Der Enrichmentfaktor EF kann als Maß für die Zunahme (EF>1) bzw. Abnahme (EF<1) der Apoptose exponierter Zellen im Vergleich zur Kontrolle herangezogen werden und somit Aufschluß über eine mögliche Induzierbarkeit von Apoptose durch die untersuchten rekombinanten Toxine geben.

Aussaat (t = -24 h). Die Zellen wurden mit 0,05% EDTA aus den nahezu konfluenten Kulturfラスchen gelöst und durch vorsichtiges Mischen mit Kulturmedium in eine homogene Einzelzellsuspension gebracht. Danach erfolgte die Zellzählung eines Aliquots von 50 µl in der Neubauer-Zählkammer mit anschließender Verdünnung auf 100.000 LZ / ml Zellsuspension. 10.000 LZ / 100µl / Well wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ für 24 Stunden inkubiert.

Toxinapplikation (t = 0). Nach 24 Stunden erfolgte die Applikation von je 100µl Kulturmedium (Kontrolle) bzw. 100µl Toxin in Endkonzentrationen von 10 bzw. 100ng/ml (exponierte Zellen). Die Mikrotiterplatten wurden für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Abbruch (t = +48 h). Die Mikrotiterplatten wurden für 10 Minuten bei 200 x g und Raumtemperatur zentrifugiert; anschließend wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pasteurpipette unter leichtem Sog abgesaugt. Nach Zugabe von 200 µl Zelllysispuffer (Fa. Boehringer Mannheim) pro Well wurden die Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 200 x g für 10 Minuten.

Als Testproben dienten desweiteren:

- Proben des o.g. Zellysates,
- DNA-Histonkomplexe als Positivkontrolle (Fa. Boehringer Mannh.)
- Inkubationspuffer als Leerwert (Fa. Boehringer Mannh.).

Je 20 µl der Testprobe wurden in die mit Streptavidin beschichteten ELISA-Mikrotiterplatten (Fa. Boehringer) transferiert und anschließend mit je 80 µl „Immunomix“ überschichtet. Die ELISA-Mikrotiterplatten wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert.

Anschließend wurden die Wells dreimal vorsichtig mit Inkubationspuffer gewaschen. Pro Well wurde

Immunomix

1/20 Anteil anti-DNA-POD

1/20 Anteil anti-Histon-Biotin

18/20 Anteile Inkubationspuffer

zur Induktion der Enzym-Substrat-Reaktion je 100µl ABTS[®]-Substrat hinzugefügt. Je nach Stärke der Farbreaktion wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit der spektrophotometrischen Messung bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 492 nm begonnen. Unter weiterer Inkubation auf einem Schüttler wurden mehrere Messungen in kurzen Abständen durchgeführt, bis die Extinktionen aufeinanderfolgender Messungen nahezu konstant blieben. Die Meßdaten wurden statistisch ausgewertet und graphisch visualisiert.

5.5 ERBB-2-Rezeptorstatus

An ausgesuchten Nierenzellkarzinomzelllinien sollte der ERBB-2-Rezeptorstatus mittels Westernblot-Analyse bestimmt werden.

Prinzip. Beim Westernblot werden Proteine zunächst durch ein- oder zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt und auf ein Nitrozellulosefilter übertragen. Anschließend wird das Filter mit einem markierten Anti-

körper, der gegen das gesuchte Protein gerichtet ist, inkubiert. In diesem Fall wurden mit Biotin markierte Antikörper verwendet; anschließend konnte das gebundene Biotin über ein entsprechendes System, welches Biotin umsetzt, visualisiert werden (ECL).

5.5.1 Proteinpräparation

Die Zellen wurden mit 0,05% EDTA aus den nahezu konfluenten Kulturflaschen gelöst, in 15-ml-Zentrifugenröhrchen umgefüllt und für 10 Minuten bei 4°C und 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet vorsichtig in PBS resuspendiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation, der Überstand wurde dekantiert. Pro Zelllinie erfolgte die Zugabe von 970µl eiskühlem RIPA-Puffer und jeweils 30µl Inhibitorenlösung (10µl PMSF-Stammlösung (10mg/ml), 20µl Aprotinin (Fa. Sigma)). Das Zellpellet wurde in dem RIPA-Puffer resuspendiert und in Eppendorf-Tubes® für 60 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte die vorsichtige Filtration durch eine 21-Gauge-Kanüle. Die Eppendorf-Tubes® wurden anschließend bei 15000 U/min und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20°C kryokonserviert und für die folgenden Versuche benutzt.

RIPA-Puffer

50 mM Tris-Cl pH 7,5

150 mM NaCl

1 % Nonidet P-40

0,5 % Natrium Desoxycholate

0,1 % SDS

5.5.2 Quantitative Gesamtproteinbestimmung nach Bradford

Um vergleichbare Proteinmengen der Tumorzellproben in der Gelelektrophorese gegeneinander auftragen zu können, wurde eine quantitative Gesamtproteinmengenbestimmung im Zellysate mit der Methode nach Bradford durchgeführt.

Prinzip. Bei der Gesamtproteinbestimmung nach Bradford bildet Serva blue G[®] mit Proteinen einen blauen Farbumschlag, der proportional zu der Proteinmenge ist und spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm quantitativ erfaßt werden kann. Durch Vergleich mit einer Albuminstandardkurve kann der Proteingehalt des Tumorzelllysats bestimmt werden.

Bradfordstammlösung

100 ml 96%-Ethanol
200 ml 88%-Phosphorsäure
350 mg Serva blue G[®]

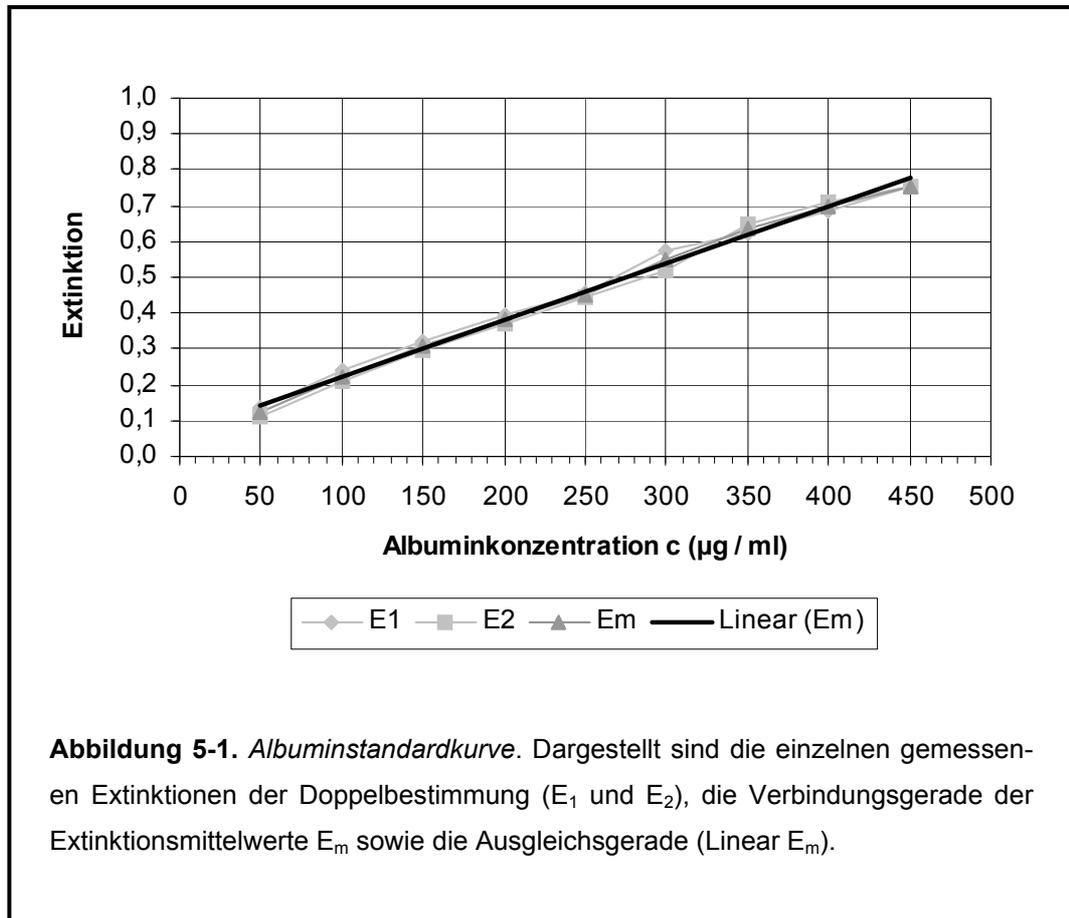
Bradfordarbeitslösung

85 ml A. dest.
3 ml 96%-Ethanol
6 ml 88%-Phosphorsäure
6 ml Bradfordstocklösung

Albuminstandardkurve. Aus einer Albuminstammlösung (1mg/ml) wurde eine Albuminverdünnungsreihe von Konzentrationen zwischen 50 und 450 µg pro ml erstellt (Doppelbestimmungen).

Nach Vorgabe eines Aliquots von jeweils 50 µl Albuminlösung aus der Albuminverdünnungsreihe in eine Glasküvette wurden 1200 µl Bradfordarbeitslösung hinzugefügt und die Extinktionen des Farbumschlages nach 10 Minuten bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen einen Leerwertabgleich mit Bradfordarbeitslösung spektralphotometrisch gemessen.

Die errechneten Extinktionsmittelwerte $M_{E1,E2}$ wurden gegen die vorgegebenen Albuminkonzentrationen in einem Diagramm aufgetragen und wiesen im untersuchten Konzentrationsbereich eine direkte lineare Beziehung zu der Albuminkonzentration auf. Die Gleichung der Ausgleichsgeraden wurde errechnet (Abbildung 5-1).



Es ergab sich rechnerisch folgende Näherung für die Gleichung der Ausgleichsgeraden: $E = 0,0016 \times c + 0,0602$

Nach Umformen erhält man: $c = \frac{E - 0,0602}{0,0016}$

Dabei bezeichnen E die Extinktion und c die Albuminkonzentration in µg/ml.

Bestimmung der Proteinkonzentrationen. Eine Meßküvette wurde nach Zugabe von 2-5 µl Zellysat in Abhängigkeit von dem Proteingehalt auf 50 µl Gesamtvolumen mittels Aqua dest. aufgefüllt; aus dem Verhältnis des Gesamtvolumens von 50 µl zur Lysatmenge errechnete sich der Verdün-

nungsfaktor, der bei der späteren Berechnung der Proteinkonzentration Berücksichtigung fand. 10 Minuten nach Zugabe von 1200 µl Bradford-arbeitslösung wurde die Farbextinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Nach Multiplikation der Extinktionen mit dem Verdünnungsfaktor konnten die Proteinkonzentrationen aus dem Diagramm abgelesen oder alternativ exakt aus der korrigierten Formel (Abbildung 5-2), in welcher der Verdünnungsfaktor Berücksichtigung findet, errechnet werden.

$$c = \frac{E - 0,0602}{0,0016} \times VF$$

Abbildung 5-2. Korrigierte Formel zur Bestimmung der Proteinkonzentration. Der Verdünnungsfaktor VF der Proteinprobe findet hier rechnerische Berücksichtigung. c ergibt die Proteinkonzentration in dem Proteinlysate in µg/ml, E bezeichnet den Extinktionsmittelwert.

Tabelle 5-6 führt die Ergebnisse der Extinktionsmessungen in den Proteinproben auf.

ZELLINIE	EXTINKTIONS- MITTELWERT E_M	VERDÜNNUNGS- FAKTOR VF	PROTEIN- KONZENTRATION c (mg / ml)	Volumen V (μ l)
clearCa-2	0,512	25	7,1	4,2
clearCa-4	0,485	25	6,7	4,5
clearCa-6	0,720	10	4,2	7,3
clearCa-15	0,425	25	5,8	5,3
chromphi-1	0,654	25	9,3	3,2
chromphi-2	0,371	25	4,9	6,1
chromphi-3	0,766	10	4,4	6,8
chromphi-4	0,937	50	27,5	1,1
chrompho-B	0,628	10	3,6	8,4
A431	0,720	25	10,4	2,9

Tabelle 5-6. *Quantitative Gesamtproteinbestimmung nach Bradford.* Die Proteinkonzentrationen c wurden aus den Extinktionsmittelwerten sowie dem Verdünnungsfaktor nach der Formel in Abbildung 5-2 berechnet. Dargestellt ist ferner das Volumen, welches 30 μ g Proteine enthält. Dieses Proteinvolumen wurde in die Geltaschen der Elektrophoresegele instilliert.

5.5.3 Tris-Glyzin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Prinzip. Die Elektrophorese basiert auf der Tatsache, daß sich gelöste Moleküle im elektrischen Feld mit einer Geschwindigkeit bewegen, die vom Verhältnis der Ladungen zu der Masse der Moleküle abhängt. Ihre Dissoziation wird von dem anionischen Detergens SDS, einem Natriumsalz von Dodecylsulfat, in Kombination mit einem Reduktionsmittel und

Hitze, vermittelt. Im Durchschnitt bindet jede Aminosäure ein Detergensmolekül. Bei neutralem pH-Wert ist das Detergens negativ geladen, so daß sich die unmittelbar benachbart stehenden, negativ geladenen SDS-Moleküle gegenseitig abstoßen. Die Proteine werden dadurch mit den daran gebundenen Detergensmolekülen gezwungen, eine stäbchenförmige Gestalt mit gleichen Ladungs- / Masse-Quotienten einzunehmen. Die denaturierten Proteine binden SDS in einer Menge, die nahezu proportional zu ihrem Molekulargewicht und unabhängig von ihrer Sequenz ist. Dadurch werden sie, je nach Länge, unterschiedlich stark negativ geladen und weisen im elektrischen Feld ein unterschiedliches Wanderungsverhalten auf. Durch das Benutzen von Markerproteinen mit bekannten Molekulargewichten ist es möglich, das Wanderungsverhalten der zu bestimmenden Proteine mit dem der Marker zu vergleichen und so Rückschluß auf das Molekulargewicht der Proteine zu bekommen (*Shapiro et al., 1969; Weber et al., 1969*).

Nach Durchwandern eines Sammelgels hoher Porosität akkumulieren die Protein-SDS Komplexe in einer dünnen Zone am Übergang zum Trenngel. Im Trenngel wandern die Protein-SDS-Komplexe entsprechend ihrer Ladung unterschiedlich weit auf die Anode zu (*Laemmli et al., 1970*).

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde ein vertikales, eindimensionales Polyacrylamidgel mit diskontinuierlichem Puffer-System benutzt. Probe und Sammelgel enthielten Tris-Cl pH 6,8, das Trenngel enthielt Tris-Cl pH 8,8 und das obere und untere Reservoir Tris-Glyzin pH 8,3. Alle Systemkomponenten enthielten 0,1 % SDS.

Trenngel. Als Trenngel wurde ein 6%iges SDS-Acrylamid-Gel hergestellt. Das gepufferte SDS-Acrylamid-Bisacrylamid-Gemisch wurde nach Zugabe von Ammoniumpersulfat und Temed[®] zwischen die Platten des Gelelektrophoreseapparatus gegossen. Temed[®] beschleunigt die Poly-

Trenngel 6%

7,9 ml H₂O
 3,0 ml 30% Acrylamid-Mix
 3,8 ml 1,5 M Tris-Puffer (pH 8,8)
 150 µl 10% SDS
 150 µl 10% Ammoniumpersulfat
 12 µl Temed®

merisation von Acrylamid und Bisacrylamid durch Katalysierung der Bildung freier Radikale aus Ammoniumpersulfat. Diese freien Radikale sind für die Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid notwendig. Um später eine glatte Oberfläche am Übergang zum Sammelgel gewährleisten zu können, wurde das Trenngel mit einer geringen Menge 0,1% SDS überschichtet. Nach einer Stunde Polymerisationsdauer wurde das überschichtete SDS wieder entfernt und mit Aqua dest. gespült.

Sammelgel. Als Sammelgel wurde ein 5%iges SDS-Acrylamid-Gemisch verwendet. Das Gemisch wurde über das Trenngel geschichtet. In jedes Sammelgel wurde unverzüglich ein Teflonkamm mit jeweils 10 Slots gesteckt. Es wurde eine 1-stündige Polymerisationsdauer bei Raumtemperatur abgewartet. Anschließend wurden die Kämmen vorsichtig entfernt und die Geltaschen mit A. dest. gespült.

Sammelgel 5%

2,7 ml H₂O
 670 µl 30% Acrylamid-Mix
 500 µl 1,0 M Tris-Puffer (pH 6,8)
 40 µl 10% SDS
 40 µl 10% Ammoniumpersulfat
 4 µl Temed®

Elektrophorese. Die fertig polymerisierten Gele wurden in den Gelelektrophoreseapparat eingespannt. Tris-Glyzin-Puffer wurde als Gelelektrophoresepuffer in die Kammern eingefüllt.

Tris-Glyzin-Puffer

25 mM Tris Base
 250 mM Glycin pH 8,3
 0,1% SDS

Proteinproben. 30 µg Proteinlysat wurden zu gleichen Volumenanteilen (10 µl + 10 µl) mit 2xSDS-Gelprobenpuffer in eisgekühlte Eppendorf-Tubes[®] gefüllt. Als Molekulargewichtsmarker wurde ein biotinylierter SDS-Page-High-Range-Marker (Fa. Bio-rad) benutzt. Er wurde wie die Proteinproben im Verhältnis 1+1 mit 2x-SDS-Gelprobenpuffer verdünnt und

2xSDS-Gelprobenpuffer

100 mM Tris-Cl pH 6,8
4% SDS
0,2% Bromphenol-Blau
20% Glycerol
200 mM Dithiothreitol

desweiteren wie eine Proteinprobe behandelt. Die Proteinproben und der Molekulargewichtsmarker wurden für 2 Minuten bei 95°C erhitzt, anschließend wurden sie bis zum Einbringen in die Geltaschen des Sammelgels auf Eis gekühlt. Mit einer Hemmingway-Nadel wurden maximal 15 µl jedes Protein-Puffergemisches in die Geltaschen des Sammelgels gefüllt. Luftblasen wurden vermieden. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel für eine Dauer von 1,5 Stunden durchgeführt.

Mit oben beschriebenem Verfahren wurden pro Elektrophoresevorgang zwei identisch belegte Gele hergestellt, die anschließend unterschiedlich weiterverarbeitet wurden. Ein Trenngel wurde anschließend nach Coomassie gefärbt, um das Gel auf gleichmäßige Proteinmengenverteilung zu überprüfen. Das andere Trenngel wurde für den eigentlichen Blottingvorgang auf Nitrozellulose verwendet.

Coomassie-Färbung. Ein Gel wurde optional in Coomassie-staining-Lösung gelegt und für etwa 3,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gel über Nacht bei 4°C in Coomassie-destaining-Lösung

Coomassie-Färbelösung

0,025 % Coomassie Blue
40 % Methanol
7 % Essigsäure
A. dest.

Coomassie-Entfärbelösung

40% Methanol
7% Acetic acid
A. dest.

entfärbt, auf ein in A. dest. getränktes 3MM-Whatman-Papier gelegt, mit Folie bedeckt und danach bei 80°C für 2 Stunden in einem Gel-Trockner getrocknet. Die gleichmäßige Verteilung und Proteinbeladung wurde beurteilt.

Elektroblotting. Das andere Trenngel wurde geblottet. Hierzu wurden auf die Anode der Blottingkammer drei in Transferpuffer getränkte 3MM-What-

Transferpuffer

39 mM Glyzin
48 mM Tris-base
0,037% SDS
20% Methanol

man[®]-Papiere gelegt, darauf ein in A. dest. getränktes Nitrozellulosefilter, dann das Gel und anschließend wieder drei 3MM-Whatman-Papiere.

Es wurde für die Dauer von 90 Minuten bei einer konstanten Stromstärke von 150mA geblottet. Um den erfolgreichen Proteintransfer von dem Gel auf

die Nitrozellulose überprüfen zu können, wurde das geblottete Gel anschließend nach Coomassie (s.o.) gefärbt; bei optimalem Proteintransfer waren kaum noch Proteinbanden zu erkennen. Das Nitrozellulosefilter wurde nach Ponceau angefärbt.

Ponceau-Färbung. Die Nitrozellulose wurde für 3-4 Minuten in Ponceau-Arbeitslösung gelegt und leicht bei Raumtemperatur geschüttelt.

Nach Abspülen mit Aqua dest. stellten sich die transferierten Proteinbanden dar. Die Banden des Molekulargewichtsmarkers wurden mit einem Stift auf die Nitrozellulose eingezeichnet.

10xPonceau-Stammlösung

2 g Ponceau S
30 g Trichloressigsäure
30 g Sulfosalicylsäure
H₂O ad 100ml

Ponceau-Arbeitslösung

1 Anteil Stocklösung
+ 9 Anteile A. dest.

Blocken des Nitrozellulosefilters. Das Nitrozellulosefilter wurde mit 0,1 ml Blockinglösung (1% BSA, 5% nonfat dried milk, A. dest.) pro cm² Nitro-

zellulose unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Blockinglösung verworfen.

Inkubation mit Erstantikörper. Umgehend erfolgte eine 3-stündige Inkubation des Filters in 0,1 ml Erstantikörper-Blockinglösung-Gemisch (Antikörper-Konzentration 1:1000) pro cm² Nitrozellulose auf einem Schüttler bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Erstantikörper-Blockinglösung-Gemisch verworfen. Das Nitrozellulosefilter wurde dreimal für jeweils 10 Minuten in PBS gewaschen, anschließend erfolgte eine 10-minütige Inkubation in phosphatfreiem Waschpuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl pH 7,5, A. dest.).

Inkubation mit Zweitantikörper. Es folgte eine 1-stündige Inkubation in 0,1ml Zweitantikörper-Blockinglösung-Gemisch (Antikörperkonzentration 1:2000) pro cm² Nitrozellulose unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Zweitantikörper-Blockinglösung-Gemisch verworfen und das Nitrozellulosefilter 4 Mal für je 10 Minuten in Waschpuffer gewaschen.

ECL-Detektion. Mittels verstärkender Lumineszenztechnik („Enhanced chemiluminescence“, ECL-Amersham[®]) erfolgte die Detektion antikörpergebundener Proteine auf dem Nitrozellulosefilter mit Visualisierung auf Hybond[®]-Röntgenfilmen. Das Nitrozellulosefilter wurde dafür exakt für 1 Minute in ECL-Gebrauchslösung (ECL-Lösung-1 + -2 im Verhältnis 1+1, Fa. Amersham) inkubiert. Danach erfolgte die Exposition auf einem Röntgenfilm für einige Minuten mit anschließender Entwicklung.

6 Ergebnisse

6.1 MTT-Zellproliferationsassay

Mittles MTT-Test wurde das Zellwachstum bei insgesamt 21 Nierenzellkarzinomzelllinien nach Exposition gegenüber den rekombinanten Toxinen untersucht, davon 15 klarzellige (clearCa), 4 chromophile (chromphi) und 2 chromophobe (chrompho) Zelllinien.

Statistik. Für alle Zelllinien wurde die Zellzahl Toxin-exponierter Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Mittelwert aus 3 Experimenten) bestimmt. Mittels Student's T-Test wurde die Signifikanz der Ergebnisse bei einem Testniveau von $p < 0,05$ überprüft. Die signifikanten Prozentwerte der Zellwachstumshemmungen einschließlich ihrer Standardabweichungen wurden für die einzelnen Zelllinien und rekombinanten Toxine als Balkendiagramme dargestellt (Abbildungen 6-1, 6-2, 6-3).

Reduktion der Zellzahl durch scFv(FRP5)-ETA

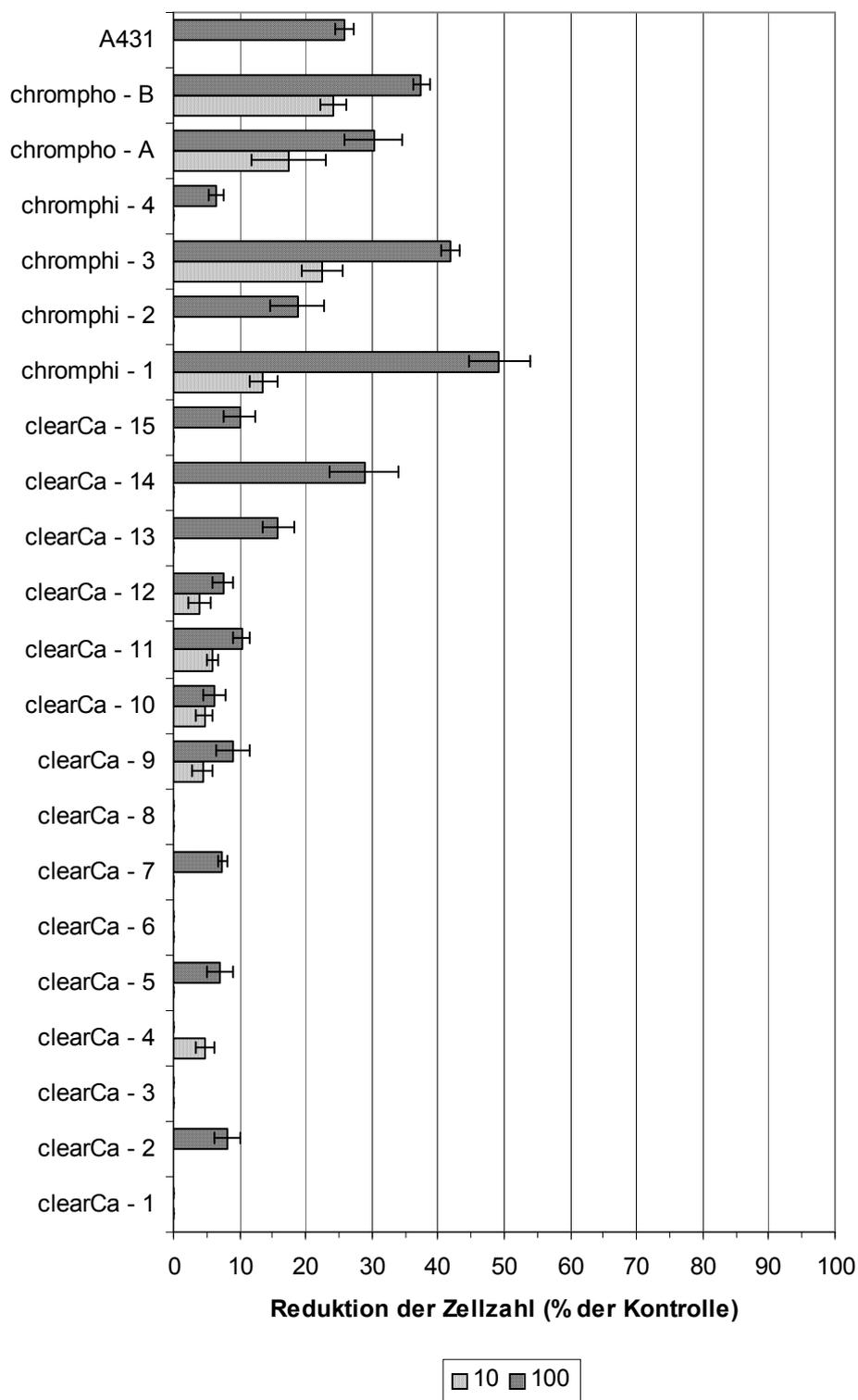


Abbildung 6-1. Signifikante ($p < 0,05$) Reduktion der Zellzahl durch 10 bzw. 100 ng/ml scFv(FRP5)-ETA (gezeigt werden ausschließlich signifikante Effekte).

Reduktion der Zellzahl durch scFv(225)-ETA

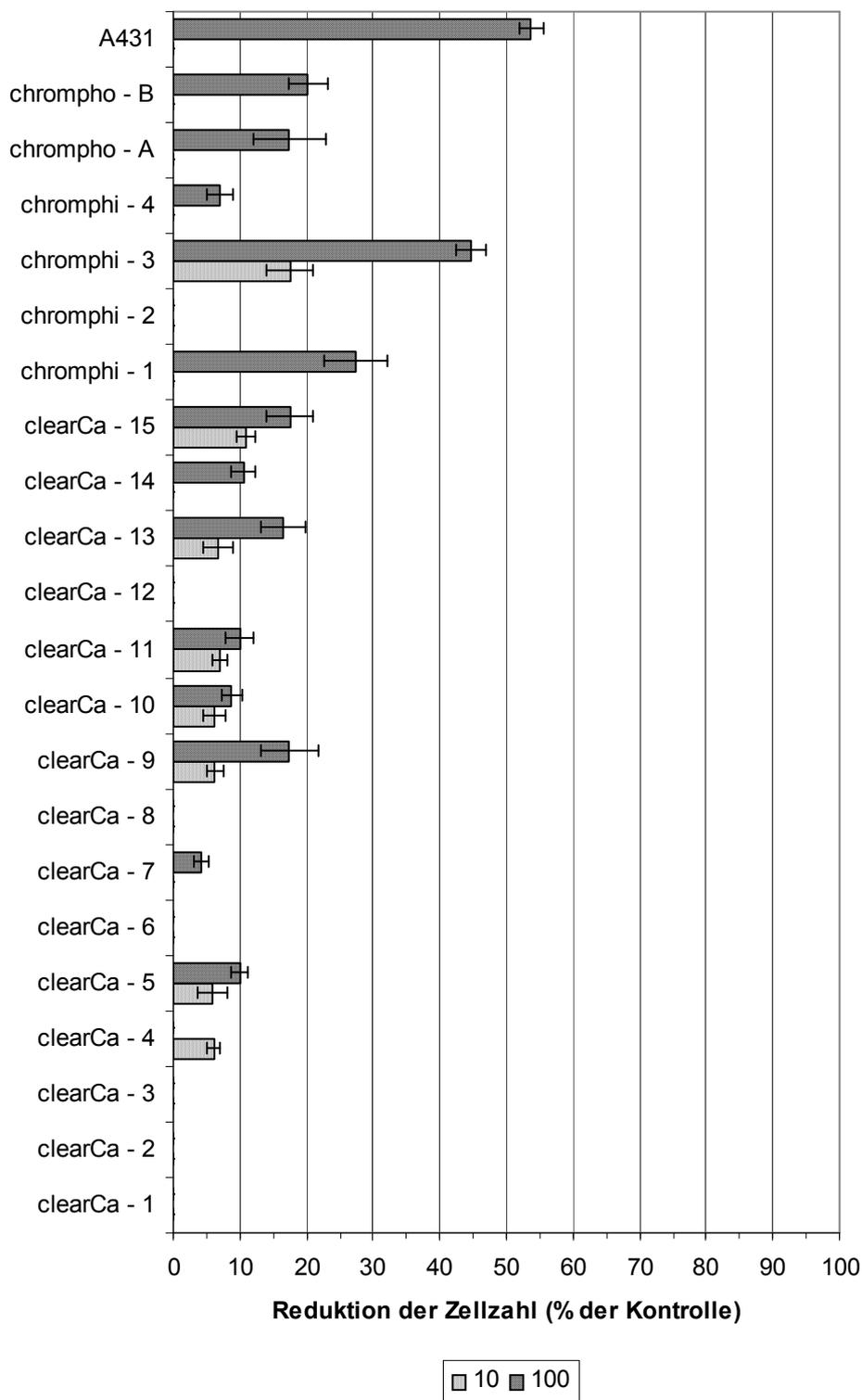


Abbildung 6-2. Signifikante ($p < 0,05$) Reduktion der Zellzahl durch 10 bzw. 100 ng/ml scFv(225)-ETA (gezeigt werden ausschließlich signifikante Effekte).

Reduktion der Zellzahl durch TGF- α -ETA

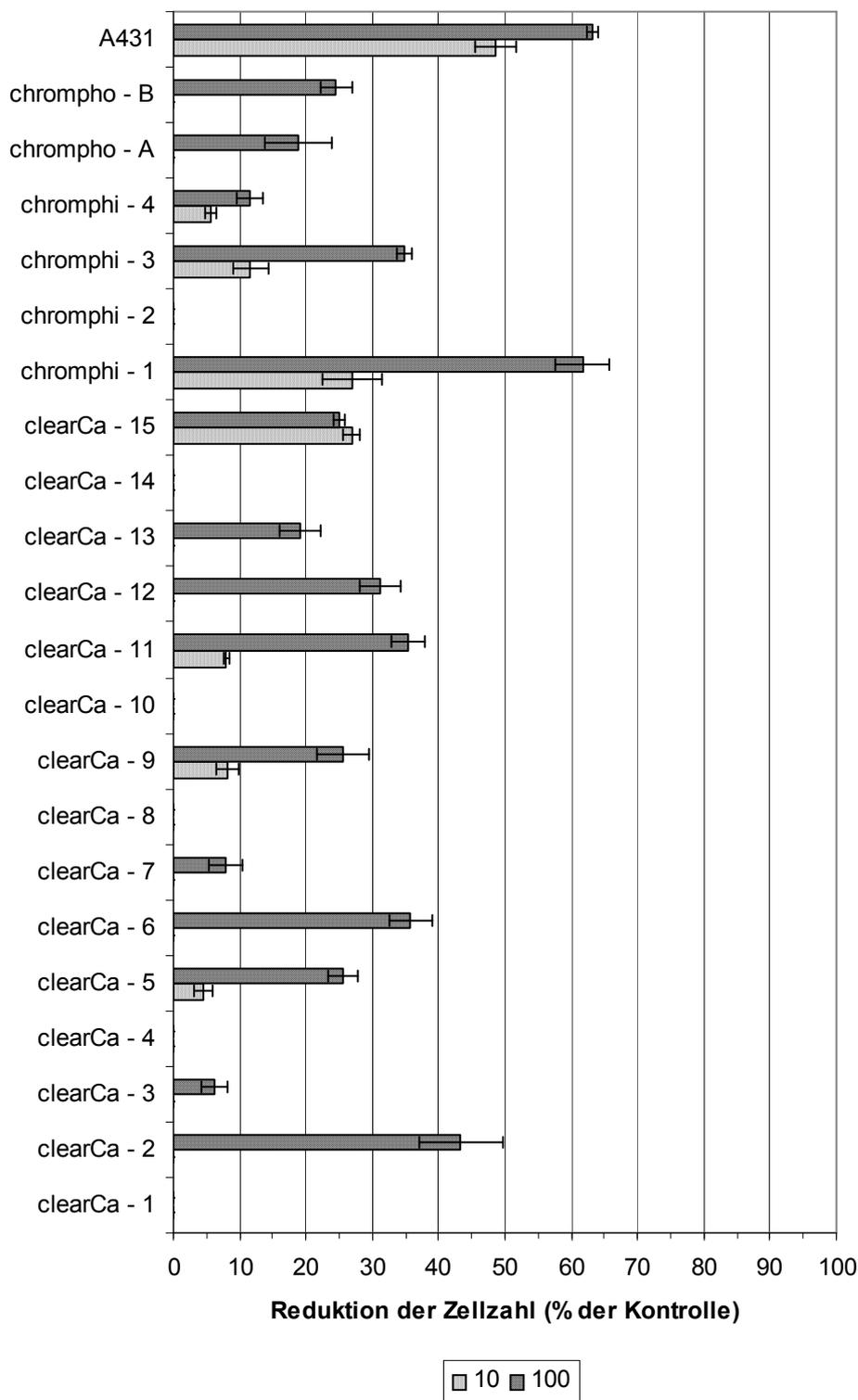


Abbildung 6-3. Signifikante ($p < 0,05$) Reduktion der Zellzahl durch 10 bzw. 100 ng/ml TGF- α -ETA (gezeigt werden ausschließlich signifikante Effekte).

Die Reduktion der Zellzahl ($p < 0,05$) wurde je nach Ausmaß unterschiedlichen Gruppen zugeordnet (Tabelle 6-1).

	SYMBOL	REDUKTION	REDUKTION DER ZELLZAHL %
nicht signifikant $p \geq 0,05$	•	keine	n.s.
signifikant $p < 0,05$	(+)	schwach	$x < 10$
	+	mäßig	$10 \leq x < 30$
	++	stark	$30 \leq x < 50$
	+++	sehr stark	$50 \leq x$

Tabelle 6-1. Legende für die Gruppenzuordnung in Abhängigkeit vom Ausmaß der Reduktion der Zellzahl x durch die rekombinanten Toxine im MTT.

Tabelle 6-2 (Seite 53) gibt einen Überblick über die Gruppenzuordnung in Abhängigkeit vom Ausmaß der Reduktion der Zellzahl durch die rekombinanten Toxine im MTT.

scFv(FRP5)-ETA.

Klarzellige RCC. 10 von 15 klarzelligen Nierenzellkarzinomlinien zeigten keine signifikante Reaktion auf 10 ng/ml scFv(FRP5)-ETA, die anderen reagierten mit einer schwachen Reduktion der Zellzahl um maximal 10%. Nach Exposition mit 100 ng/ml scFv(FRP5)-ETA zeigten nur noch 5 von 15 klarzelligen Zelllinien keine signifikante Wachstumsinhibition, während die übrigen Zelllinien signifikant in ihrem Wachstum gehemmt werden konnten, davon 6 Zelllinien schwach um maximal 10% und die übrigen 4

Zelllinien mäßig zwischen 10 und 30%. In der Gruppe der scFv(FRP5)-ETA-exponierten klarzelligen Zelllinien konnte keine Zellwachstumshemmung über 30% beobachtet werden.

Die klarzelligen Nierenkarzinomzelllinien clearCa-1, -3, -6 und -8 waren in

c (ng/ml)	scFv-(FRP5)-ETA		scFv-(225)-ETA		TGF- α -ETA	
	10	100	10	100	10	100
clearCa - 1	•	•	•	•	•	•
clearCa - 2	•	(+)	•	•	•	++
clearCa - 3	•	•	•	•	•	(+)
clearCa - 4	(+)	•	(+)	•	•	•
clearCa - 5	•	(+)	(+)	(+)	(+)	+
clearCa - 6	•	•	•	•	•	++
clearCa - 7	•	(+)	•	(+)	•	(+)
clearCa - 8	•	•	•	•	•	•
clearCa - 9	(+)	(+)	(+)	+	(+)	+
clearCa - 10	(+)	(+)	(+)	(+)	•	•
clearCa - 11	(+)	+	(+)	+	(+)	++
clearCa - 12	(+)	(+)	•	•	•	++
clearCa - 13	•	+	(+)	+	•	+
clearCa - 14	•	+	•	+	•	•
clearCa - 15	•	+	+	+	+	+
chromphi - 1	+	++	•	+	+	+++
chromphi - 2	•	+	•	•	•	•
chromphi - 3	+	++	+	++	+	++
chromphi - 4	•	(+)	•	(+)	(+)	+
chrompho - 1	+	++	•	+	•	+
chrompho - 2	+	++	•	+	•	+
A431	(+)	+	•	+++	++	+++

Tabelle 6-2. Zuordnung zu Gruppen unterschiedlicher Empfindlichkeit gegenüber den rekombinanten Toxinen im MTT. Als Legende vgl. Tabelle 6.1. • = n. s.

ihrem Proliferationsverhalten nicht signifikant hemmbar und können bei den untersuchten Konzentrationen als **resistent** gegenüber scFv(FRP5)-

ETA angesehen werden. ClearCa-2, -4, -5, -7, -9, -10 und -12 reagierten gegenüber 10 bzw. 100 ng/ml scFv(FRP5)-ETA maximal um 10% und können somit zu der Gruppe der **schwach sensiblen** Zelllinien gegenüber scFv(FRP5)-ETA gezählt werden. ClearCa-11, -13, -14, -15 reagierten auf 10 bzw. 100 ng/ml scFv(FRP5)-ETA mit einer Wachstumsinhibition um maximal 30% und können gemäß der aufgestellten Gruppeneinteilung als **mäßig sensible** Zelllinien gegenüber dieser Substanz eingestuft werden.

Chromophile RCC. 2 von 4 chromophilen Zelllinien zeigten keine signifikante Reaktion gegenüber 10 ng/ml scFv(FRP5)-ETA, die anderen beiden Zelllinien waren mäßig hemmbar. Bei Konzentrationen von 100 ng/ml scFv(FRP5)-ETA waren alle vier chromophilen Zelllinien signifikant hemmbar: Je eine Zelllinie zeigte eine schwache bzw. mäßige, die beiden anderen chromophilen Zelllinien eine starke Reduktion der Zellzahl.

Die chromophilen Nierenzellkarzinome waren somit alle durch scFv(FRP5)-ETA signifikant hemmbar. Chromphi-4 reagierte nur **schwach**, chromphi-2 **mäßig**. Im Gegensatz dazu waren chromphi-1 und -3 in ihrem Proliferationsverhalten durch scFv(FRP5)-ETA **stark** hemmbar.

Chromophobe RCC. Sowohl 10 ng/ml als auch 100 ng/ml scFv(FRP5)-ETA konnten signifikant das Zellwachstum beider chromophober Nierenzellkarzinomlinien im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle hemmen: 10 ng/ml scFv(FRP5)-ETA hemmte beide Zelllinien mäßig um 10-30% in ihrem Wachstum, 100 ng/ml scFv(FRP5)-ETA wies starke antiproliferative Effekte auf. Beide chromophobe hRCC können somit zu den **stark sensiblen** Zelllinien gegenüber scFv(FRP5)-ETA gezählt werden.

scFv(225)-ETA.

Klarzellige RCC. 8 von 15 klarzelligen Nierenzellkarzinomlinien reagierten nicht signifikant auf die Exposition gegenüber 10 ng/ml scFv(225)-ETA. Von den übrigen 7 signifikant hemmbaren Zelllinien reagierten 6 nur schwach und eine mäßig. Bei Konzentrationen von 100 ng/ml scFv(225)-ETA waren unter 8 signifikant hemmbaren Zelllinien 3 in der Gruppe der schwach sensiblen und 5 in der Gruppe der mäßig sensiblen Zelllinien. ClearCa-1, -2, -3, -6, -8 und -12 reagierten nicht signifikant auf scFv(225)-ETA und können somit zu den scFv(225)-ETA-**resistenten** Zelllinien gezählt werden. ClearCa-4, -5, -7 und -10 reagierten mit Wachstumshemmungen unter 10% und fallen somit in die Gruppe der **schwach sensiblen** Zelllinien gegenüber diesem rekombinanten Toxin. Die Zelllinien clearCa-9, -11, -13, -14 und -15 können zu der Gruppe der **mäßig sensiblen** Zelllinien gegenüber scFv(225)-ETA gezählt werden.

Chromophile RCC. Nur 1 von 4 chromophilen Zelllinien konnte durch 10 ng/ml scFv(225)-ETA mäßig in ihrem Wachstum gehemmt werden. Durch Steigerung der Toxinkonzentration auf 100 ng/ml waren 3 von 4 chromophilen Zelllinien signifikant hemmbar, jeweils eine schwach, mäßig und stark.

Bei den chromophilen Karzinomzelllinien war chromphi-2 **nicht signifikant** und chromphi-4 nur **schwach** hemmbar. Chromphi-1 kann zu der Gruppe der **mäßig sensiblen**, chromphi-3 zu der Gruppe der **stark sensiblen** Zelllinien gegenüber scFv(225)-ETA gezählt werden.

Chromophobe RCC. Während 10 ng/ml scFv(225)-ETA bei keiner der beiden chromophoben Zelllinien eine signifikante Zellwachstumshemmung hervorzurufen vermochte, konnte durch 100 ng/ml scFv(225)-ETA bei beiden Zelllinien das Zellwachstum mäßig stark inhibiert werden. Die beiden

chromophoben Zelllinien werden beide somit zu den **mäßig sensiblen** Zelllinien gegenüber scFv(225)-ETA gerechnet.

TGF- α -ETA.

Klarzellige RCC. 11 von 15 klarzelligen Nierenkarzinomzelllinien konnten nicht durch 10 ng/ml TGF- α -ETA in ihrem Wachstum gehemmt werden. 3 signifikant hemmbare klarzellige Zelllinien wurden schwach, eine mäßig in ihrer Proliferation gehemmt. Bei einer Konzentration von 100 ng/ml waren nur noch 5 von 15 klarzelligen Zelllinien nicht signifikant hemmbar. 2 von 10 sensiblen Zelllinien wiesen eine schwache, je 4 eine mäßige bzw. starke Reduktion ihrer Zellzahl auf.

ClearCa-1, -4, -8, -10 und -14 waren nicht signifikant hemmbar und können somit in den untersuchten Toxinkonzentrationen als **TGF- α -ETA-resistent** angesehen werden. ClearCa-3 und -7 reagierten mit **schwacher** Zellwachstumshemmung. ClearCa-5, -9, -13 und -15 wiesen **mäßige** Sensibilität gegenüber TGF- α -ETA auf. In den Zelllinien clearCa-2, -6, -11 und -12 konnte das Zellwachstum bis maximal 50% gehemmt werden; sie gehören somit zu den **stark sensiblen** Zelllinien gegenüber TGF- α -ETA.

Chromophile RCC. Eine von vier chromophilen Nierenkarzinomzelllinien wurde in ihrem Wachstum nicht signifikant gehemmt. Bei den signifikant hemmbaren chromophilen Zelllinien wurde durch 10 ng/ml TGF- α -ETA einmal eine schwache und zweimal ein mäßige Zellwachstumshemmung induziert. Durch die höhere Konzentration von 100 ng/ml wurden 3 chromophile Zelllinien signifikant gehemmt, je eine mäßig, stark bzw. sehr stark.

Chromphi-2 konnte nicht in ihrem Wachstum gehemmt werden und kann deshalb als **resistent** gegenüber TGF- α -ETA angesehen werden. Chromphi-4 konnte um maximal 30% gehemmt werden und gehört zu den **mäßig**

sensiblen Zelllinien. Chromphi-3 wies **starke** Sensibilität gegenüber TGF- α -ETA auf. Ein **sehr starker** antiproliferativer Effekt ließ sich bei der Zelllinie chromphi-1 beobachten.

Chromophobe RCC. Durch 10 ng/ml TGF- α -ETA konnte bei keiner der beiden chromophoben Nierenkarzinomzelllinien eine signifikante Reduktion der Zellzahl erzielt werden. Erst eine Konzentrationssteigerung auf 100 ng/ml TGF- α -ETA rief eine mäßige Wachstumshemmung beider Zelllinien hervor. Beide chromophoben hRCC gehören somit zu den **mäßig sensiblen** Zelllinien gegenüber TGF- α -ETA gemäß der hier aufgestellten Gruppenzuordnung.

6.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbungen: Mitose- und Apoptoserate.

Es wurden pro Zelllinie und rekombinantes Toxin jeweils 2000 Zellen nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung lichtmikroskopisch bei einer Vergrößerung von 1 : 400 ausgezählt und dabei sowohl apoptotische als auch mitotische Ereignisse gezählt. Die Ergebnisse der Zählung führt Tabelle 6-3 auf.

	clearCa-2		chromphi-1		chrompho-B	
	A	M	A	M	A	M
Kontrolle	9,0	3,0	1,5	13	15,5	10,5
scFv(FRP5)-ETA	26,5	3,5	21,5	0	114,5	0,5
scFv(225)-ETA	18,5	5,0	18,5	1,0	27,5	6,5
TGF-α-ETA	134,0	1,5	67	0	40,5	3,0

Tabelle 6-3. Anzahl (‰) von Apoptosen (= A) bzw. Mitosen (= M) in un-behandelten (Kontrolle) bzw. mit je 100 ng/ml Toxin behandelten Zellen.

Enrichmentfaktor. Die Häufigkeit apoptotischer bzw. mitotischer Ereignisse in Toxin-exponierten Zelllinien und den unbehandelten Kontrollen wurde zueinander in Beziehung gesetzt und als Enrichmentfaktor (EF_{HE}) bezeichnet. Ein Enrichmentfaktor größer als 1 zeigt die Zunahme der Apoptose- bzw. Mitosehäufigkeit in Toxin-exponierten Zelllinien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle an, ein Enrichmentfaktor kleiner als 1 deren Abnahme. Definitionsgemäß ist der Enrichmentfaktor der Kontrollen gleich eins. Er errechnet sich nach den Formeln in Abbildung 6-4.

$$EF_{Apoptose} = \frac{Apoptosehäufigkeit_{\text{exponiert}}}{Apoptosehäufigkeit_{\text{Kontrolle}}}$$

$$EF_{Mitose} = \frac{Mitosehäufigkeit_{\text{exponiert}}}{Mitosehäufigkeit_{\text{Kontrolle}}}$$

Abbildung 6-4. Formeln zur Errechnung der Enrichmentfaktoren (EF) in Toxin-exponierten bzw. unbehandelten Zellen (Kontrolle).

Die Tabellen 6-4 und 6-5 führen die nach o.g. Formeln errechneten Enrichmentfaktoren für apoptotische bzw. mitotische Ereignisse auf.

$EF_{Apoptose}$	clearCa-2	chromphi-1	chrompho-B
Kontrolle	1,0	1,0	1,0
scFv(FRP5)-ETA	2,9	14,3	7,4
scFv(225)-ETA	2,1	12,3	1,8
TGF-α-ETA	14,9	44,7	2,6

Tabelle 6-4. Darstellung der Enrichmentfaktoren $EF_{Apoptose}$. Zu erkennen ist die Zunahme der Apoptosehäufigkeit ($EF_{Apoptose} > 1$) in allen Toxin-exponierten Zellen im Vergleich zu der Kontrolle ($EF_{Apoptose} = 1$).

EF_{Mitose}	clearCa-2	chromphi-1	chrompho-B
Kontrolle	1,00	1,00	1,00
scFv(FRP5)-ETA	0,64	0,00	0,05
scFv(225)-ETA	0,91	0,08	0,62
TGF-α-ETA	0,27	0,00	0,29

Tabelle 6-5. Dargestellt sind die Enrichmentfaktoren EF_{Mitose} errechnet nach der Formel in Abbildung 6-4. Zu erkennen ist eine Abnahme der Mitosehäufigkeit ($EF_{\text{Mitose}} < 1$) in allen Toxin-exponierten Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle ($EF_{\text{Mitose}} = 1$).

Apoptosen. In den drei untersuchten Zelllinien clearCa-2, chromphi-1 und chrompho-B wiesen die unbehandelten Kontrollen die niedrigste Anzahl an Apoptosen auf. Nach Toxin-Exposition nahm die Häufigkeit apoptotischer Ereignisse zu.

In den Nierenzellkarzinomzelllinien clearCa-2 und chromphi-1 rief TGF- α -ETA von allen rekombinanten Toxinen die stärkste Zunahme der Apoptosehäufigkeit hervor; dabei nahm in clearCa-2 die Apoptosehäufigkeit um etwa das 15-fache ($EF_{\text{Apoptose}}=14,9$) bzw. in chromphi-1 sogar um das knapp 45-fache ($EF_{\text{Apoptose}}=44,7$) im Vergleich zur Kontrolle zu, während in chrompho-B nur eine Steigerung der Apoptose um einen Faktor von 2,6 erreicht wurde. In clearCa-2 und chromphi-1 zeigte sich eine zunehmende Apoptoseinduzierbarkeit in aufsteigender Reihenfolge durch scFv(225)-ETA, scFv(FRP5)-ETA und schließlich durch TGF- α -ETA als potentestem Apoptoseinduktor.

Für chrompho-B zeigte sich die größte Induzierbarkeit von Apoptose nach scFv(FRP5)-ETA-Exposition mit einem Enrichmentfaktor von 7,4.

In allen drei untersuchten Zelllinien rief scFv(225)-ETA generell weniger apoptotische Ereignisse hervor als scFv(FRP5)-ETA. Bei allen Zelllinien

rief TGF- α -ETA mehr Apoptosen hervor als scFv(225)-ETA. scFv(225)-ETA scheint somit von den untersuchten rekombinanten Toxinen der schwächste Apoptoseinduktor zu sein.

Mitosen. Alle untersuchten rekombinanten Toxine hatten einen antimitogenen Effekt ($EF < 1$) auf die Tumorzellen:

Bei der Zelllinie clearCa-2 wurde die Mitoserate durch TGF- α -ETA auf 27 % der Kontrolle und etwas weniger stark durch scFv(FRP5)-ETA auf 64 % der Kontrolle reduziert. scFv(225)-ETA bewirkte eine nur geringe Mitosehemmung mit einem Enrichmentfaktor von 91 %.

Bei der Zelllinie chromphi-1 waren lichtmikroskopisch bei 2000 ausgezählten Zellen in den mit scFv(FRP5)-ETA bzw. TGF- α -ETA behandelten Zellen keine mitotischen Ereignisse mehr nachweisbar; auch scFv(225)-ETA hatte einen starken antimitogenen Effekt ($EF_{\text{Mitose}} = 0,08$).

Für chrompho-B war der stärkste antimitogene Effekt durch scFv(FRP5)-ETA mit einer Reduktion der Mitoserate auf 5 % der Kontrolle auslösbar, danach weniger stark durch TGF- α -ETA. scFv(225)-ETA reduzierte die Mitoserate im Vergleich zur Kontrolle am wenigsten.

Die Reduktion der Zellzahl wurde mit dem Ausmaß der Apoptoseinduktion sowie der Hemmung der Mitoserate korreliert (Tabellen 6-6, 6-7 und 6-8).

clearCa-2	A (‰)	M (‰)	REDUKTION DER ZELLZAHL (%)
Kontrolle	9,0	5,5	0
scFv(FRP5)-ETA	26,5	3,5	8,1
scFv(225)-ETA	18,5	5,0	0
TGF-α-ETA	134,0	1,5	43,3

Tabelle 6-6. *ClearCa-2*. Zwischen der Apoptose- (=A) und Mitosehäufigkeit (=M) zeigt sich ein Korrelationskoeffizient von -0,93. Die Apoptoserate und die Reduktion der Zellzahl im MTT sind mit 0,99, die Mitosefrequenz und die Reduktion der Zellzahl gegenläufig mit -0,95 miteinander korreliert.

chromphi-1	A (‰)	M (‰)	REDUKTION DER ZELLZAHL (%)
Kontrolle	1,5	13,0	0
scFv(FRP5)-ETA	21,5	0	49,2
scFv(225)-ETA	18,5	1,0	27,5
TGF-α-ETA	67,0	0	61,7

Tabelle 6-7. *Chromphi-1*. Zwischen der Apoptose- und Mitosehäufigkeit zeigt sich ein Korrelationskoeffizient von -0,64. Die Apoptoserate und die Reduktion der Zellzahl im MTT sind mit 0,86, die Mitosefrequenz und die Reduktion der Zellzahl gegenläufig mit -0,89 miteinander korreliert.

chrompho-B	A (‰)	M (‰)	REDUKTION DER ZELLZAHL (%)
Kontrolle	15,5	10,5	0
scFv(FRP5)-ETA	114,5	0,5	37,4
scFv(225)-ETA	27,5	6,5	20,2
TGF-α-ETA	40,5	3,0	24,6

Tabelle 6-8. *Chrompho-B*. Die Apoptose- und die Mitosenrate wiesen einen Korrelationskoeffizienten von -0,85 auf. Zwischen Apoptoserate und Reduktion der Zellzahl im MTT zeigte sich ein Korrelationskoeffizient von 0,85. Mitosefrequenz und Reduktion der Zellzahl sind mit -0,98 miteinander gegenläufig stark korreliert.

6.3 Cell death detection ELISA^{PLUS}®

Die Abbildungen auf Seite 63 zeigen die zeitliche Entwicklung der Extinktionen nach ABTS[®]-Substratzugabe zum Zeitpunkt t = 00:00 (Mittelwerte der korrigierten doppelbestimmten Readerwerte, Ordinate) für die drei untersuchten Zelllinien clearCa-2, chromphi-1 und chrompho-2. Auf der Abszisse ist die Reaktionsdauer dargestellt. Die Extinktion wurde zu sechs Zeitpunkten bestimmt, frühestens nach 3 Minuten, spätestens nach 22 Minuten. Dadurch wurde für den Meßzeitpunktbereich eine lineare Beziehung der Reaktionskinetik gewährleistet.

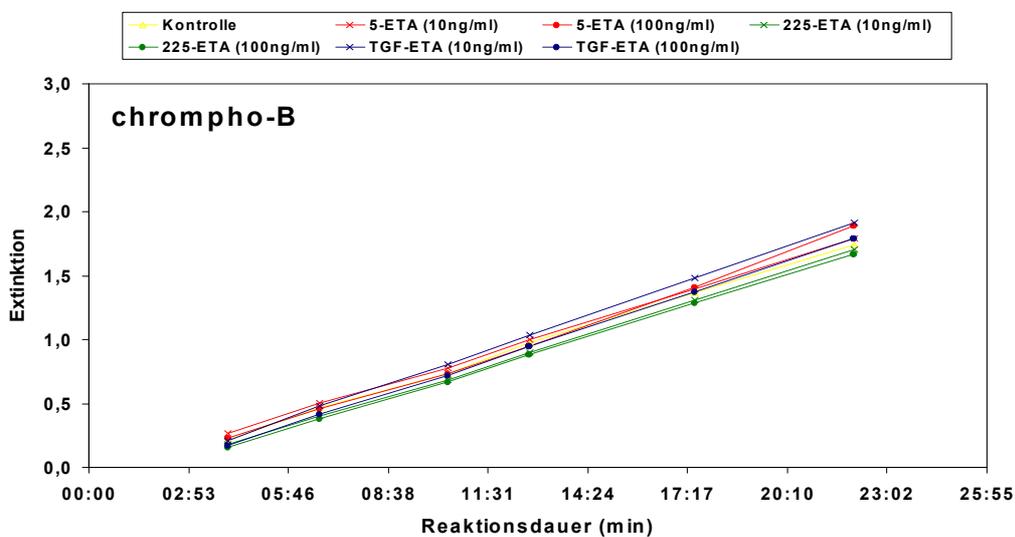
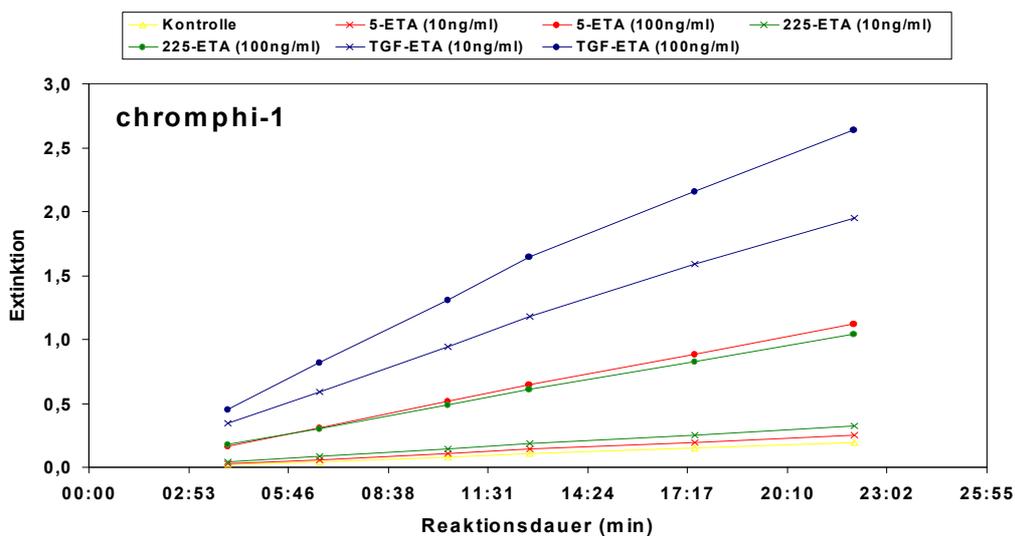
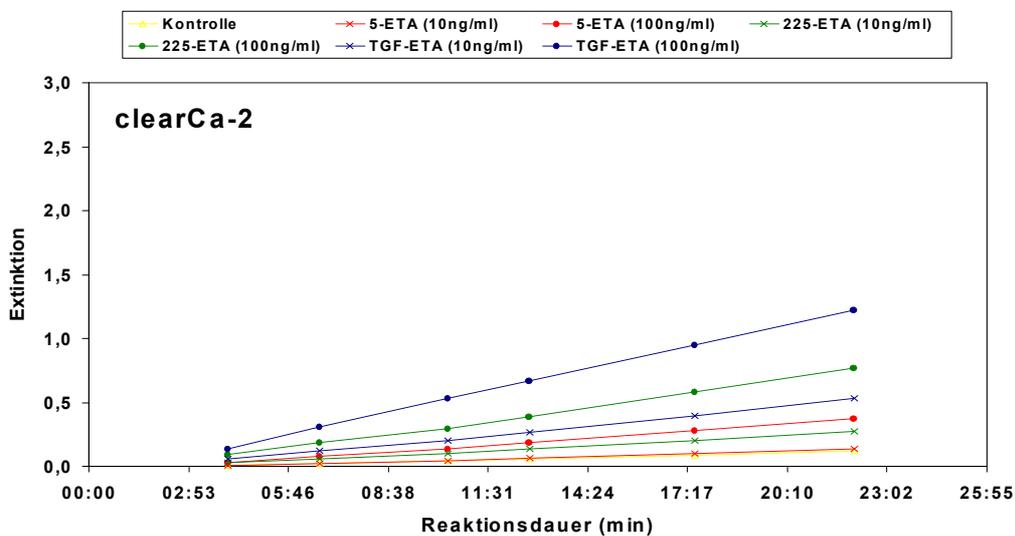
Die Mittelwerte der korrigierten Extinktionswerte Toxin-exponierter Zellen ($M_{\text{exponiert}}$) wurden zu den Mittelwerten der korrigierten Extinktionswerte der unbehandelten Zellen ($M_{\text{Kontrolle}}$) in Beziehung gesetzt. Man erhält dadurch einen Enrichmentfaktor als Maß für das Verhältnis der Apoptosehäufigkeit in behandelten Zelllinien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 6-5):

$$\text{Enrichmentfaktor} = \frac{M_{\text{exponiert}}}{M_{\text{Kontrolle}}}$$

Abbildung 6-5. Enrichmentfaktor.

Die Verläufe der Enrichmentfaktoren sind graphisch für jeden Zeitpunkt der Messung in den Abbildungen auf Seite 65 dargestellt.

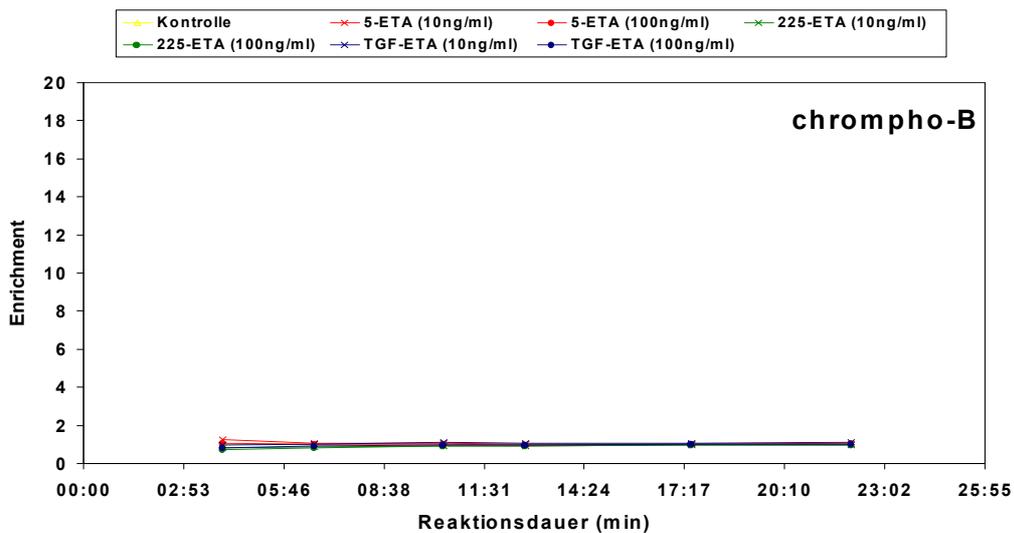
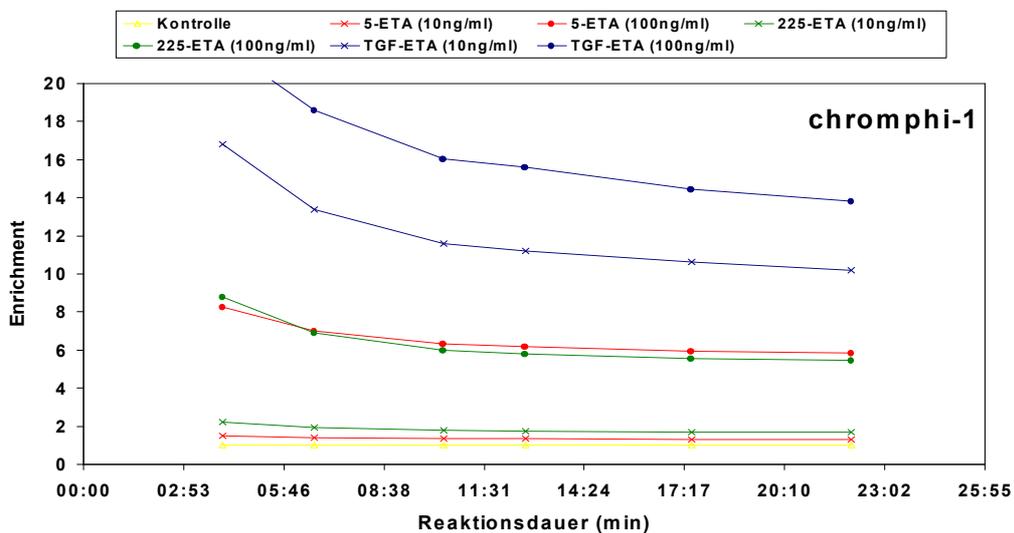
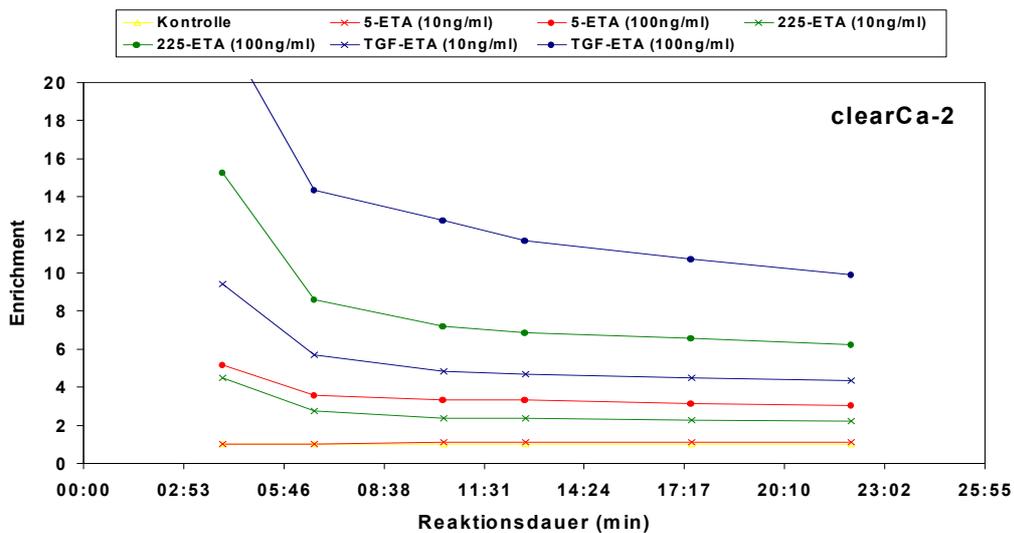
Vergleichbare Enrichmentfaktoren wurden dem Meßzeitpunkt t = 17:17 Minuten entnommen, da hier aufgrund des annähernd parallelen Verlaufs der Enrichmententwicklung zur Abszisse, wie aus den Abbildungen auf Seite 65 ersichtlich, bei allen Zelllinien eine lineare Reaktionskinetik anzunehmen war. Der Enrichmentfaktor der Kontrolle ergibt sich aus obiger Formel mit $EF_{\text{Kontrolle}} = 1$.



clearCa-2. Es zeigt sich eine Konzentrationsabhängigkeit der Apoptoseinduktion für alle rekombinanten Toxine: Das stärkste Enrichment zeigte sich bei 100 ng/ml TGF- α -ETA (EF~11), etwa nur halb so groß war der Effekt durch 10 ng/ml TGF- α -ETA (EF~5). Ein Enrichmentfaktor von etwa 7,5 wurde durch 100 ng/ml und von etwa 2,5 durch 10 ng/ml scFv(225)-ETA hervorgerufen. 100 ng/ml scFv(FRP5)-ETA rief eine Steigerung der Apoptoserate um etwa das 4-fache hervor. Bei 10 ng/ml scFv(FRP5)-ETA war das Enrichment kaum größer als in der Kontrolle. Selbst 10 ng/ml TGF- α -ETA induzierten eine höhere Steigerung der Apoptoserate als 100 ng/ml scFv-(FRP5)-ETA. TGF- α -ETA hatte auf *clearCa-2* den stärksten Apoptose-induzierenden Effekt, während scFv(FRP5)-ETA den geringsten Effekt zeigte. scFv(225)-ETA lag in der Wirksamkeit zwischen beiden Substanzen.

chromphi-1. Wie auch bei *clearCa-2* zeigte sich die höchste Steigerung der Apoptoserate bei *chromphi-1* durch 100 ng/ml TGF- α -ETA (EF~15) sowie durch 10 ng/ml TGF- α -ETA (EF~11). Für 100 ng/ml scFv(FRP5)-ETA und 100 ng/ml scFv(225)-ETA (EF~7) zeigten sich ungefähr gleiche Enrichmentfaktoren. Niedrige Enrichmentfaktoren von 1 bis 2 zeigten sich bei 10 ng/ml scFv(FRP5)-ETA und auch scFv(225)-ETA. Auch für *chromphi-1* schien TGF- α -ETA der potenteste Apoptoseinduktor zu sein, während 100ng/ml scFv(FRP5)-ETA bzw. scFv(225)-ETA sogar einen deutlich geringeren Effekt hervorriefen als 10 ng/ml TGF- α -ETA. Bemerkenswert ist die relativ starke Induktion von Apoptose durch die niedrige TGF- α -ETA-Konzentration.

chrompho-B. Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede der Enrichmentfaktoren zwischen der Kontrolle und den behandelten Zellen, der Enrichmentfaktor lag ungefähr bei 1.



6.4 Westernblot-Analyse

Der ERBB-2-Rezeptorstatus wurde bei vier klarzelligen, vier chromophilen und einer chromophoben Nierenzellkarzinomlinie mittels Westernblot bestimmt. Die mittels verstärkender Chemolumineszenz-Technik (ECL) visualisierten Proteinbanden sind in Abbildung 6-6 dargestellt.

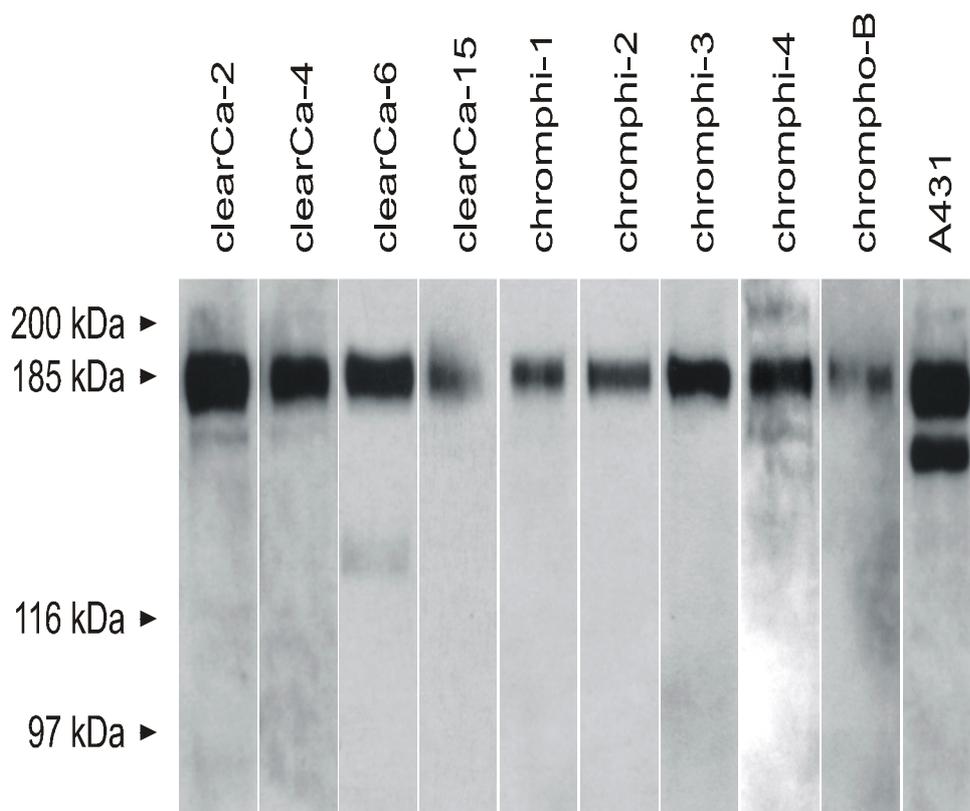


Abbildung 6-6. ERBB-2-Rezeptorexpression im Westernblot. Die Zelllinie A431 wurde als Positivkontrolle verwendet.

Das gesuchte Protein ERBB-2 ist in unterschiedlicher Ausprägung in allen untersuchten Zelllinien vorhanden. Bei gleicher Gesamtproteinmenge ist eine semiquantitative Bestimmung der ERBB-2-Rezeptormenge durch Vergleich der Bandenstärke möglich. Die stärkste Expression findet sich in den Zelllinien clearCa-2, -4 und -6 sowie bei chromphi-3 und -4, während die Expression in den übrigen Zelllinien geringer ausgeprägt ist. Ein quanti-

tativer Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der ERBB-2-Rezeptorexpression und der Reduktion der Zellzahl durch das an den ERBB-2-Rezeptor bindende scFv(FRP5)-ETA ließ sich jedoch nicht erkennen (vgl. Abbildung 6-1, S. 49).

6.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die untersuchten Nierenzellkarzinomzelllinien reagieren auf Exposition gegenüber den untersuchten rekombinanten Toxinen mit einer Reduktion ihrer Zellzahl, Steigerung der Apoptosehäufigkeit sowie einer Reduktion der Mitosefrequenz.
2. Es besteht eine Heterogenität in der Reaktion zwischen den verschiedenen rekombinanten Toxinen und den einzelnen Zelllinien, ohne daß die histologische Zuordnung der Zelllinien eine Voraussage über das Reaktionsausmaß ermöglicht.
3. Das Ausmaß von Zellwachstumshemmung, Apoptoseinduktion und Hemmung der Mitosefrequenz korrelieren eng miteinander und sind abhängig von der Dosis der untersuchten rekombinanten Toxine.
4. Der ERBB-2-Rezeptor ist in allen untersuchten Zelllinien in unterschiedlicher Ausprägung vorhanden, wobei sich jedoch kein quantitativer Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der ERBB-2-Rezeptorexpression und der Reduktion der Zellzahl durch das an den ERBB-2-Rezeptor bindende scFv(FRP5)-ETA erkennen läßt.

7 Diskussion

In Anbetracht der schlechten Prognose und der eingeschränkten Therapieoptionen bei metastasierten Nierenzellkarzinomen sollte mit der vorliegenden Arbeit die in vitro-Empfindlichkeit von Nierenzellkarzinomen gegenüber rekombinanten Toxinen untersucht werden. Dazu wurde die Sensibilität menschlicher Nierenzellkarzinomzelllinien gegenüber drei neuen rekombinanten Toxinen überprüft, die an die Zellmembranrezeptoren EGF-R und ERBB-2-Rezeptor binden.

Die untersuchten Nierenzellkarzinomlinien zeigten dabei ein heterogenes Reaktionsmuster. Das Spektrum der Zellwachstumshemmung reichte von resistent auf der einen bis hin zu einer Zellwachstumshemmung um mehr als 50% auf der anderen Seite. Die möglichen Ursachen dafür werden im folgenden diskutiert:

Sind Zellmembranrezeptoren für die Toxinwirkung notwendig?

Voraussetzung für die Vermittlung zytotoxischer Effekte durch Pseudomonas-Exotoxin-A ist die Aufnahme des Toxins in die Zelle. Diese Internalisierung wird bei den untersuchten rekombinanten Toxinen durch ihre Bindung an die Zellmembranrezeptoren EGF-R bzw. ERBB-2 vermittelt. Ein um die Bindungskomponente gekürztes rekombinantes Toxin hingegen kann nicht durch die Zellmembran gelangen (*Wels et al., 1992; Wels et al., 1995*). Das Vorhandensein eines entsprechenden Rezeptors muß deshalb prinzipiell als Voraussetzung für die Internalisierung angesehen werden.

Inwieweit erfüllen die untersuchten Nierenzellkarzinomzellen dieses Kriterium? Gibt es quantitative Unterschiede in der Rezeptorausprägung der einzelnen Zelllinien?

EGF-Rezeptor. In humanen Nierenzellkarzinomen wird eine Überexpression von EGF-Rezeptor-mRNA (*Freeman et al., 1989*) bis zum dreifachen des nicht-tumorösen Nierengewebes beschrieben (*Mydlo et al., 1989*). Die meisten nicht-papillären Nierenzellkarzinome überexprimieren dabei sowohl die Gene für den EGF-Rezeptor als auch für seinen Liganden, TGF- α (*Ishikawa et al., 1990, Gomella et al., 1989; Sargent et al., 1989*). Im Vergleich zu soliden, gemischten oder sarkomatoiden Tumoren zeigen papilläre Tumoren eine signifikant niedrigere EGF-R-Expression (*Uhlman et al., 1995*).

ERBB-2-Rezeptor. Bezüglich der Ausprägung von ERBB-2-Rezeptoren in Nierenzellkarzinomen gibt es divergente Beobachtungen. Stumm et al. beobachtete auf Proteinebene eine Überexpression von erbB2, wobei diese Überexpression statistisch signifikant mit einem höheren Tumorgrad korreliert war. Eine Amplifikation von ERBB-2-Genen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (*Stumm et al., 1996*).

In Untersuchungen von Freeman et al. war die ERBB-2-Genexpression in allen untersuchten menschlichen Nierenzellkarzinomzelllinien niedriger als in nicht-tumorösem Gewebe, eine Amplifikation des ERBB-2-Gens konnte nicht nachgewiesen werden (*Freeman et al., 1989*). Interessant sind in diesem Zusammenhang auch Arbeiten, in denen sich in klarzelligen Nierenzellkarzinomlinien sogar signifikant niedrigere ERBB-2-mRNA-Level zeigten als in dem nicht-tumorösem Nierengewebe der gleichen Patienten. Bei den chromophilen und chromophoben Nierenzellkarzinomlinien waren keine signifikanten Unterschiede in der Ausprägung von ERBB-2-mRNA im Vergleich zu nicht-tumoröser Niere feststellbar (*Rotter et al., 1992*). In keiner Zelllinie wurde eine ERBB-2-Amplifikation gefunden.

Einige Autoren beobachteten eine inverse Korrelation zwischen dem EGF-Rezeptor und der ERBB-2-mRNA-Expression mit hohen EGF-R-Spiegeln und niedriger ERBB-2-Genexpression (*Weidner et al., 1990*). In anderen

Arbeiten war hingegen eine Co-Überexpression von ERBB-2 und EGF-R signifikant mit einer Metastasierung vergesellschaftet (*Stumm et al., 1996*).

Alle in dieser Arbeit untersuchten Nierenzellkarzinome weisen in unterschiedlichem Ausmaß die Expression von EGF-Rezeptorproteinen auf (*Ramp et al., 1997, u.a.*). Zudem konnte in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Westernblot-Analysen in allen untersuchten Zelllinien in unterschiedlicher Ausprägung das Vorhandensein des Zellmembranrezeptors ERBB-2 nachgewiesen werden. Zusammenfassend kann man also sagen, daß nach Analyse des EGF-R- und ERBB-2-Rezeptor-Status alle in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien über die notwendige Voraussetzung verfügen, die Toxine an Membranrezeptoren binden und damit internalisieren zu können. Eine Korrelation zwischen der EGF-R- bzw. ERBB-2-Ausprägung auf Proteinebene und der Sensibilität der Tumorzellen auf die untersuchten rekombinanten Toxine ergab sich in den hier durchgeführten Untersuchungen jedoch nicht. Die genannten Rezeptoren scheinen somit zwar eine qualitativ notwendige Voraussetzung für die Wirkung von rekombinanten Toxinen zu sein, erlauben aufgrund der Quantität ihrer Ausprägung jedoch keine Vorhersage über das Reaktionsausmaß der Zelllinien gegenüber den untersuchten Toxinen.

Welche Rolle spielt die rezeptorbindende Komponente des rekombinanten Toxins?

Eine bedeutende Rolle für das Ausmaß der Wachstumshemmung der Nierenzellkarzinomzellen scheint die rezeptorbindende Komponente der untersuchten rekombinanten Toxine zu spielen, wobei die Bindungsaffinität des Toxins an den Rezeptor sowie die Aktivierung des Rezeptors durch seinen Liganden von Bedeutung ist:

Bindungsaffinität. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß TGF- α -ETA im Vergleich zu den anderen Toxinen die höchste Wachstumshemmung

durch eine Apoptoseinduktion sowie durch eine Hemmung der Proliferation mit Abnahme der Mitoserate hervorruft. scFv(225)-ETA, welches am gleichen Rezeptor wie TGF- α -ETA bindet, war bei vergleichbarer Dosis in keinem der durchgeführten Versuche stärker wirksam als TGF- α -ETA. Möglicherweise besitzt TGF- α -ETA (welches den natürlichen Liganden beinhaltet) zu dem EGF-Rezeptor eine höhere Bindungsaffinität als scFv(225)-ETA (Fan et al., 1993; Wels et al., 1995). Da sowohl scFv(225)- als auch TGF- α -ETA mit tumoreigenem EGF um die Bindung an dem EGF-Rezeptor konkurrieren, kann TGF- α -ETA als Toxin mit einer höheren Bindungsaffinität mehr Rezeptoren als scFv(225)-ETA besetzen und dadurch auch in größerer Menge in die Zellen aufgenommen werden.

Aktivierung. Neben der Affinität des rekombinanten Toxins zu seinem Rezeptor moduliert auch die Interaktion des Toxins mit dem Rezeptor selbst das Ausmaß der Zellantwort. TGF- α -ETA ist das einzige der untersuchten rekombinanten Toxine, welches den Rezeptor aktiviert. TGF- α , und vermutlich auch TGF- α -ETA, scheint nach Aufnahme in die Zelle sehr schnell in den Endosomen degradiert zu werden, so daß eine schnelle Rückkehr des Rezeptors an die Zelloberfläche möglich ist – der Rezeptor steht dann als Rezeptor für weitere Toxinmoleküle zur Verfügung. Es resultiert ein schneller Rezeptorumsatz mit beschleunigter Toxininternalisation. Außerdem vermögen TGF- α (und möglicherweise auch TGF- α -ETA) eine Zunahme von EGF-R-mRNA und somit auch der EGF-Rezeptordichte hervorzurufen (Atlas et al., 1992), die bei Toxinüberschuß im Extrazellularraum zusätzlich die verstärkte Wirksamkeit von TGF- α -ETA im Vergleich zu scFv(225)-ETA erklären könnte. Im Gegensatz dazu werden EGF und möglicherweise auch scFv(225)-ETA in den späten Lysosomen degradiert, so daß der Ligand-Rezeptorkomplex im Vergleich zu TGF- α -ETA verlängert intrazellulär resident ist und der Rezeptorumsatz deutlich geringer ist (Hamel et al., 1997).

Welche Rolle könnte der Elongation-Faktor-2 für das unterschiedliche Reaktionsmuster der Tumorzelllinien spielen?

Aus der Literatur ist bekannt, daß das Exotoxin-A von *Pseudomonas-aeruginosa*-Bakterien in Zellen verschiedener Spezies über eine ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors-2 Apoptosen oder Apoptose-ähnliche Phänomene hervorrufen kann, wobei der Mechanismus des apoptotischen Zellunterganges bisher unklar ist.

Mit dieser Arbeit konnte dieses Phänomen auch für zusammengesetzte rekombinante Toxine, die ETA enthalten, nachgewiesen werden: Unabhängig von ihrer rezeptorbindenden Komponente haben alle untersuchten rekombinanten Toxine nach Internalisierung in unterschiedlichem Ausmaß zu einer Induktion von Apoptosen geführt. Eine Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der untersuchten Nierenzellkarzinomzelllinien könnte auch in dem komplexen Regelkreislauf um den Elongationsfaktor-2 (EF-2) zu suchen sein: So resultiert eine Phosphorylierung des EF-2 durch ETA in einer kompletten Inaktivierung des Translationssystems (*Ryazanov et al., 1989*). Phosphoryliertes EF-2 kann zusätzlich auch die Aktivität von nicht-phosphoryliertem EF-2 inhibieren (*Ryazanov et al., 1988*). Die Inaktivierung von EF-2 durch *Pseudomonas*-Exotoxin-A ist auf die Präsenz eines post-transitionell modifizierten Histidin-Restes, genannt Diphthamid (2-[3-Carboxyamido-3-(trimethylammonio)propyl]histidin) (*Chen et al., 1988*), angewiesen. EF-2 kann solange nicht phosphoryliert werden, wie Histidin nicht modifiziert ist (*Foley et al., 1995*). Dabei ist Diphthamid gleichzeitig notwendig für die Phosphorylierung und auch selbst der Ort der Phosphorylierung (*Phan et al., 1993*).

Auch Mutationen des EF-2 scheinen bei verschiedenen Tumoren eine nicht unbedeutende Rolle zu spielen und könnten auch für Nierenzellkarzinome eine Erklärung für das unterschiedliche Ansprechen auf die untersuchten rekombinanten Toxine bieten: So beschrieben Foley et al. bei Hamster-Ovar-Zelllinien Punktmutationen in Toxin-resistenten Allelen

von EF-2. Diese Mutationen führten zu Aminosäuresubstitutionen an mehreren Positionen, wobei alle Mutationen die Biosynthese von Diphthamid verhinderten (Foley et al., 1995). Trotz EF-2-Expression schien die katalytische Funktion von EF-2 dadurch deutlich vermindert oder aufgehoben zu sein. Es wäre deshalb zu überprüfen, ob möglicherweise auch in einigen Nierenzellkarzinomzelllinien EF-2-Mutationen vorliegen, die die Empfänglichkeit für eine ETA-Blockade herabsetzen.

Lassen sich Vorhersagen bezüglich der Empfindlichkeit von Nierenzellkarzinomen gegenüber rekombinanten Toxinen machen?

In allen untersuchten Zelllinien konnte durch die in dieser Arbeit untersuchten rekombinanten Toxine die Apoptosefrequenz dosisabhängig gesteigert werden. Gleichzeitig nahm ausnahmslos die Mitoserate ab. Beobachtet man bei Tumoren generell eine Verschiebung des Apoptose-Mitoseverhältnisses zugunsten der Mitoserate, so konnte hier durch den Einsatz von rekombinanten Toxinen dieses Verhältnis wieder in Richtung Apoptose verschoben und so eine Reduktion der Tumorzellzahl in vitro erzielt werden. Apoptoseinduktion, Reduktion der Mitoserate und Reduktion der Tumorzellzahl waren dabei so eng miteinander korreliert, daß es möglich scheint, in Kurzzeitkulturen von Nierenkarzinomzellen das individuelle Ansprechen auf die rekombinanten Toxine auszutesten, bevor sie klinisch eingesetzt werden.

Lässt sich in Abhängigkeit von dem histologischen Typ der Nierenzellkarzinomzelllinien eine Vorhersage für das Ansprechen gegenüber den untersuchten Toxinen machen?

Der histologische Typ der Nierenzellkarzinome läßt keine generelle Voraussage über die Sensibilität gegenüber bestimmten rekombinanten Toxinen zu. Die hier vorliegenden Untersuchungen zeigen jedoch, daß viele Nierenzellkarzinome prinzipiell sensibel gegenüber der Therapie mit den hier vorgestellten rekombinanten Toxinen sind.

8 Referenzen

1. Altenschmidt, U, Schmidt, M, Groner, B, Wels, W: **Targeted therapy of schwannoma cells in immunocompetent rats with an erbB2-specific antibody-toxin.** *Int-J-Cancer*, 73(1), 117 - 24, 1997
2. Aref, I, Bociek, RG, Salhani, D : **Is post-operative radiation for renal cell carcinoma justified?.** *Radiother-Oncol*, 43(2), 155 - 7, 1997
3. Atlas, I, Mendelsohn, J, Baselga, J, Fair, WR, Masui, H, Kumar, R: **Growth regulation of human renal carcinoma cells: role of transforming growth factor alpha.** *Cancer-Res*, 52(12), 3335 - 9, 1992
4. Aulitzky, W, Gastl, G, Aulitzky, WE, Herold, M, Kemmler, J, Mull, B, Frick, J, Huber, C: **Successful treatment of metastatic renal cell carcinoma with a biologically active dose of recombinant interferon-gamma.** *J-Clin-Oncol*, 7(12), 1875 - 84, 1989
5. Benmerah, A, Gagnon, J, Begue, B, Megarbane, B, Dautry, VarsatA, Cerf, BensussanN: **The tyrosine kinase substrate eps15 is constitutively associated with the plasma membrane adaptor AP-2.** *J-Cell-Biol*, 131(6 Pt 2), 1831 - 8, 1995
6. Boehringer : **Cell death detection ELISA.** *BoehMan*, 1996
7. Boll, W, Gallusser, A, Kirchhausen, T : **Role of the regulatory domain of the EGF-receptor cytoplasmic tail in selective binding of the clathrin-associated complex AP-2.** *Curr-Biol*, 5(10), 1168 - 78, 1995
8. Brinkmann, U, Reiter, Y, Jung, SH, Lee, B, Pastan, I: **A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment.** *Proc-Natl-Acad-Sci-USA*, 90(16), 7538 - 42, 1993

-
9. Brinkmann, U, Pastan, I : **Immunotoxins against cancer** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1198, 27 - 45, 1994
10. Brossart, P, Stuhler, G, Flad, T, Stevanovic, S, Rammensee, HG, Kanz, L, Brugger, W: **Her-2/neu-derived peptides are tumor-associated antigens expressed by human renal cell and colon carcinoma lines and are recognized by in vitro induced specific cytotoxic T lymphocytes.** *Cancer-Res*, 58(4), 732 - 6, 1998
11. Buizza, C, Antonelli, D, Chisena, S, Bernasconi, S, Zaroli, A, Belloni, M, Mandressi, A: **[Conservative therapy in renal carcinoma: follow-up] TO: Terapia conservativa nel carcinoma renale: follow up.** *Arch-Ital-Urol-Androl*, 69(2), 93 - 100, 1997
12. Carpenter, G : **Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens** *Annu Rev Biochem*, 56, 881 - 914, 1987
13. Carraway III, KL3rd, Cantley, LC : **A neu acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signaling.** *Cell*, 78(1), 5 - 8, 1994
14. Carraway III, KL, Burden, SJ : **Neuregulins and their receptors.** *Curr-Opin-Neurobiol*, 5(5) - 12, 1995 b
15. Carraway III, KL, Soltoff, SP, Diamonti, AJ, Cantley, LC: **Heregulin stimulates mitogenesis and phosphatidylinositol 3-kinase in mouse fibroblasts transfected with erbB2/neu and erbB3.** *J-Biol-Chem*, 270(13), 7111 - 6, 1995 a
16. Chan, SD, Antoniucci, DM, Fok, KS, Alajoki, ML, Harkins, RN, Thompson, SA, Wada, HG: **Heregulin activation of extracellular acidification in mammary carcinoma cells is associated with expression of HER2 and HER3.** *J-Biol-Chem*, 270(38), 22608 - 13, 1995

17. Chaudhary, VK, Fitzgerlad, DJ, Adhya, S, Pastan, I: **Activity of a recombinant fusion protein between transforming growth factor type alpha and Pseudomonas toxin.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 4538 - 4542, 1987
18. Chen, JY, Bodley, JW : **Biosynthesis of diphthamide in Saccharomyces cerevisiae. Partial purification and characterization of a specific S-adenosylmethionine: elongation factor 2 methyltransferase.** *J-Biol-Chem*, 263(24), 11692 - 6, 1988
19. Classen, M, Diehl, V, Kochsiek, K : **Parenchymatöse Nierentumoren.** *Innere Medizin*, 1230 - 1234, 1993
20. Earp, HS, Dawson, TL, Li, X, Yu, H: **Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research.** *Breast-Cancer-Res-Treat*, 35(1), 115 - 32, 1995
21. Fa. Boehringer Mannheim : **Cell Death Detection ELISA PLUS.** *Test principle*
22. Fan, Z, Masui, H, Altas, I, Mendelsohn, J: **Blockade of epidermal growth factor receptor function by bivalent and monovalent fragments of 225 anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies.** *Cancer-Res*, 53(18), 4322 - 8, 1993
23. Foley, BT, Moehring, JM, Moehring, TJ : **Mutations in the elongation factor 2 gene which confer resistance to diphtheria toxin and Pseudomonas exotoxin A. Genetic and biochemical analyses.** *J-Biol-Chem*, 270(39), 23218 - 25, 1995
24. Freeman, MR, Washecka, R, Chung, LW : **Aberrant expression of epidermal growth factor receptor and HER-2 (ERBB-2) messenger RNAs in human renal cancers.** *Cancer-Res*, 49(22), 6221 - 5, 1989

25. Gadella, Jr., T, Jovin, TM : **Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved Fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation.** *Journal of cell biology*, 129(6), 1543 - 1558, 1995
26. Gerharz, CD, Ramp, U, Olert, J, Moll, R, Storkel, S, Marx, N, Gabbert, HE: **Cytomorphological, cytogenetic, and molecular biological characterization of four new human renal carcinoma cell lines of the clear cell type.** *Virchows Arch*, 424(4), 403 - 9, 1994
27. Gerharz, CD, Moll, R, Storkel, S, Ramp, U, Hildebrandt, B, Molsberger, G, Koldovsky, P, Gabbert, HE: **Establishment and characterization of two divergent cell lines derived from a human chromophobe renal cell carcinoma.** *Am J Pathol*, 146(4), 953 - 62, 1995
28. Gerharz, CD, Hildebrandt, B, Moll, R, Ramp, U, Sarbia, M, Storkel, S, Koldovsky, P, Gabbert, HE: **Chromophilic renal cell carcinoma: cytomorphological and cytogenetic characterisation of four permanent cell lines.** *Br J Cancer*, 74(10), 1605 - 1614, 1996
29. Goldman, R, Ben Levi, R, Peles, E, Yarden, Y: **Heterodimerization of the erbB-1 and ERBB-2 receptors in human breast carcinoma cells: a mechanism for receptor transregulation.** *Biochemistry*, 29, 11024 - 11028, 1990
30. Gomella, LG, Sargent, ER, Wade, TP, Anglard, P, Linehan, WM, Kasid, A: **Expression of transforming growth factor alpha in normal human adult kidney and enhanced expression of transforming growth factors alpha and beta1 in renal cell carcinoma.** *Cancer Res*, 49, 6972 - 6975, 1989
31. Gonzalez, MinguezCL, Lorenzo, MartinezR, Lorente, GarinJA, de, ToresRamirez I, Vidal, RosellMT: **[Chromophobe renal cell carcinoma:**

- immunohistochemical study of 7 cases] TO: Carcinoma renal de células cromofobas: estudio inmunohistoquímico de siete casos. *Actas-Urol-Esp*, 21(6), 558 - 63, 1997**
- 32. Graus, PortaD, Beerli, RR, Daly, JM, Hynes, NE: ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO-J*, 16(7), 1647 - 55, 1997**
- 33. Groenen, LC, Walker, F, Burgess, AW, Treutlein, HR: A model for the activation of the epidermal growth factor receptor kinase involvement of an asymmetric dimer? *Biochemistry*, 36(13), 3826 - 36, 1997**
- 34. Gullick, WJ : The role of the epidermal growth factor receptor and the c-ERBB-2 protein in breast cancer. *Int J Cancer*, 5, 55 - 61, 1990**
- 35. Gullick, WJ : Type I growth factor receptors: current status and future work. *Biochem Soc Symp*, 63, 193 - 198, 1998**
- 36. Gulliford, TJ, Huang, GC, Ouyang, X, Epstein, RJ: Reduced ability of transforming growth factor-alpha to induce EGF receptor heterodimerization and downregulation suggests a mechanism of oncogenic synergy with ErbB2. *Oncogene*, 15(18), 2219 - 2223, 1997**
- 37. Hamel, FG, Siford, GL, Jones, J, Duckworth, WC: Intraendosomal degradation of transforming growth factor alpha. *Mol Cell Endocrinol*, 126(2), 185 - 192, 1997**
- 38. Harwerth, IM, Wels, W, Marte, B, Hynes, NE: Monoclonal antibodies against the extracellular domain of the ERBB-2 receptor function as partial ligand agonists. *J Biol Chem*, 267, 15160 - 15167, 1992**

39. Hertler, AA, Frankel, AE : **Immunotoxins: a clinical review of their use in the treatment of malignancies.** *J-Clin-Oncol*, 7(12), 1932 - 42, 1989
40. Hofmockel, G, Riess, S, Bassukas, ID, Dammrich, J: **Epidermal growth factor family and renal cell carcinoma: expression and prognostic impact.** *Eur-Urol*, 31(4), 478 - 84, 1997
41. Hogemann, I, Bock, S, Heppner, P, Petrides, PE: **Cytogenetic and growth factor gene analysis of a renal carcinoma cell line.** *Cancer-Genet-Cytogenet*, 78(2), 175 - 80, 1994
42. Holmes, WE, Sliwkowski, MX, Akita, RW, Henzel, WJ, Lee, J, Park, JW, Yansura, D, Abadi, N, Raab, H, Lewis, GD: **Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2.** *Science*, 256(5060), 1205 - 10, 1992
43. Iglewski, WJ : **Cellular ADP-ribosylation of elongation factor 2.** *Mol-Cell-Biochem*, 138(1-2), 131 - 3, 1994
44. Ishikawa, J, Maeda, S, Umezu, K, Sugiyama, T, Kamidono, S: **Amplification and overexpression of the epidermal growth factor receptor gene in human renal-cell carcinoma.** *Int-J-Cancer*, 45(6), 1018 - 21, 1990
45. Kaneda, Y, Yoshida, MC, Kohno, K, Uchida, T, Okada, Y: **Chromosomal assignment of the gene for human elongation factor 2.** *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A*, 81(10), 3158 - 62, 1984
46. Kavolius, JP, Mastorakos, DP, Pavlovich, C, Russo, P, Burt, ME, Brady, MS: **Resection of metastatic renal cell carcinoma.** *J-Clin-Oncol*, 16(6), 2261 - 6, 1998

-
47. Kern, JA, Schwartz, DA, Nordberg, JE, Weiner, DB, Greene, MI, Torney, L, Robinson, RA: **p185neu expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival.** *Cancer-Res*, 50(16), 5184 - 7, 1990
48. Kimata, Y, Harashima, S, Kohno, K : **Expression of non-ADP-ribosylatable, diphtheria toxin-resistant elongation factor 2 in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biochem-Biophys-Res-Commun*, 191(3), 1145 - 51, 1993
49. Kimata, Y, Kohno, K : **Elongation factor 2 mutants deficient in diphthamide formation show temperature-sensitive cell growth.** *J-Biol-Chem*, 269(18), 13497 - 501, 1994
50. Kochi, SK, Collier, RJ : **DNA fragmentation and cytolysis in U937 cells treated with diphtheria toxin or other inhibitors of protein synthesis.** *Exp-Cell-Res*, 208(1), 296 - 302, 1993
51. Kohno, K, Uchida, T : **Highly frequent single amino acid substitution in mammalian elongation factor 2 (EF-2) results in expression of resistance to EF-2-ADP-ribosylating toxins.** *J-Biol-Chem*, 262(25), 12298 - 305, 1987
52. Kornilova, E, Sorkina, T, Beguinot, L, Sorkin, A: **Lysosomal targeting of epidermal growth factor receptors via a kinase-dependent pathway is mediated by the receptor carboxyl-terminal residues 1022-1123.** *J Biol Chem*, 271(48), 30340 - 30346, 1996
53. Laemmli, UK : **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T.** *Nature*, 227, 680 - 685, 1970
54. Langer, W, Hofmockel, G, Theiss, M, Frohmuller, H: **[Surgical treatment of metastases in renal cell carcinoma] TO:**

Metastasen Chirurgie beim Nierenzellkarzinom. *Urologe-A*, 36(6), 548 - 51, 1997

55. Lemmon, MA, Bu, Z, Ladbury, JE, Zhou, M, Pinchasi, D, Lax, I, Engelman, DM, Schlessinger, J: Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *EMBO-J*, 16(2), 281 - 94, 1997

56. Li, M, Dyda, F, Benhar, I, Pastan, I, Davies, DR: The crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin domain III with nicotinamide and AMP: conformational differences with the intact exotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(20), 9308 - 12, 1995

57. Li, W, Hack, N, Margolis, B, Ullrich, A, Skorecki, K, Schlessinger, J: Carboxy-terminal truncations of epidermal growth factor (EGF) receptor affect diverse EGF-induced cellular responses. *Cell-Regul*, 2(8), 641 - 9, 1991

58. Lyons, RM, Moses, HL : Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation. *Eur-J-Biochem*, 187(3), 467 - 73, 1990

59. Mandel, JS, McLaughlin, JK, Schlehofer, B, Mellempgaard, A, Helmert, U, Lindblad, P, McCredie, M, Adami, HO: International renal-cell cancer study. IV. Occupation. *Int J Cancer*, 61(5), 601 - 605, 1995

60. Maurer, G, Schmidt, M, Azemar, M, Altenschmidt, U, Stocklin, E, Wels, W, Groner, B: Systemic treatment with a recombinant ERBB-2 receptor-specific tumor toxin efficiently reduces pulmonary metastases in mice injected with genetically modified carcinoma cells. *Cancer-Res*, 58(12), 2661 - 6, 1998

61. McCredie, M, Stewart, JH : Risk factors for kidney cancer in New South Wales - I. Cigarette smoking. *Eur J Cancer*, 28A(12), 2050 - 2054, 1992

62. McCredie, M, Stewart, JH : **Risk factors for kidney cancer in New South Wales. IV. Occupation.** *Br J Ind Med*, 50(4), 349 - 354, 1993
63. Mickisch, GH, Pai, LH, Siegsmund, M, Campain, J, Gottesman, MM, Pastan, I: **Pseudomonas exotoxin conjugated to monoclonal antibody MRK16 specifically kills multidrug resistant cells in cultured renal carcinomas and in MDR-transgenic mice.** *J-Urol*, 149(1), 174 - 8, 1993
64. Mizutani, Y, Bonavida, B, Yoshida, O : **Cytotoxic effect of diphtheria toxin used alone or in combination with other agents on human renal cell carcinoma cell lines.** *Urol-Res*, 22(4), 261 - 6, 1994
65. Moch, H, Sauter, G, Buchholz, N, Gasser, TC, Bubendorf, L, Waldman, FM, Mihatsch, MJ: **Epidermal growth factor receptor expression is associated with rapid tumor cell proliferation in renal cell carcinoma.** *Hum-Pathol*, 28(11), 1255 - 9, 1997
66. Moolenaar, WH, Bierman, AJ, Tilly, BC, Verlaan, I, Defize, LH, Honegger, AM, Ullrich, A, Schlessinger, J: **A point mutation at the ATP-binding site of the EGF-receptor abolishes signal transduction.** *EMBO-J*, 7(3), 707 - 10, 1988
67. Morimoto, H, Bonavida, B : **Diphtheria toxin- and Pseudomonas A toxin-mediated apoptosis. ADP ribosylation of elongation factor-2 is required for DNA fragmentation and cell lysis and synergy with tumor necrosis factor-alpha.** *J-Immunol*, 149(6), 2089 - 94, 1992
68. Mosmann, T : **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays.** *JIM*, 65, 55 - 63, 1983
69. Motzer, RJ, Russo, P, Nanus, DM, Berg, WJ: **Renal cell carcinoma.** *Curr-Probl-Cancer*, 21(4), 185 - 232, 1997

70. Mucci, D, Forristal, J, Strickland, D, Morris, R, Fitzgerald, D, Saelinger, CB: **Level of receptor-associated protein moderates cellular susceptibility to pseudomonas exotoxin A.** *Infect Immun*, 63(8), 2912 - 8, 1995
71. Mydlo, JH, Michaeli, J, Cordon, CardoC, Goldenberg, AS, Heston, WD, Fair, WR: **Expression of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA in neoplastic and nonneoplastic human kidney tissue.** *Cancer-Res*, 49(12), 3407 - 11, 1989
72. Neal, DE, Bennett, MK, Hall, RR, Marsh, C, Bel, PD, Sainsbury, JRC, Harris, AL: **Epidermal-growth-factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumours.** *Lancet*, i, 366 - 368, 1985
73. Novick, AC : **The role of renal-sparing surgery for renal cell carcinoma.** *Semin Urol*, 10(1), 12 - 15, 1992
74. Omura, F, Kohno, K, Uchida, T : **The histidine residue of codon 715 is essential for function of elongation factor 2.** *Eur-J-Biochem*, 180(1), 1 - 8, 1989
75. Ou, YC, Yang, CR, Kuo, JH, Kao, YL, Cheng, CL: **Incidental renal cell carcinoma: pathologic features and survival rate.** *Chung-Hua-I-Hsueh-Tsa-Chih-Taipei*, 61(2), 71 - 6, 1998
76. Pai, LH, Gallo, MG, FitzGerald, DJ, Pastan, I: **Antitumor activity of a transforming growth factor alpha-Pseudomonas exotoxin fusion protein (TGF-alpha-PE40).** *Cancer-Res*, 51(11), 2808 - 12, 1991
77. Peles, E, Yarden, Y : **Neu and its ligands: from an oncogene to neural factors** *Bioessays*, 15, 815 - 824, 1993 a

78. Peles, E, Ben, LevyR, Tzahar, E, Liu, N, Wen, D, Yarden, Y: **Cell-type specific interaction of Neu differentiation factor (NDF/heregulin) with Neu/HER-2 suggests complex ligand-receptor relationships.** *EMBO-J*, 12(3), 961 - 71, 1993 b
79. Phan, LD, Perentesis, JP, Bodley, JW : **Saccharomyces cerevisiae elongation factor 2. Mutagenesis of the histidine precursor of diphthamide yields a functional protein that is resistant to diphtheria toxin.** *J-Biol-Chem*, 268(12), 8665 - 8, 1993
80. Pinkas-Kramarski, R, Lenferink, AE, Bacus, SS, Lyass, L, van de Poll, ML, Klapper, LN, Tzahar, E, Sela, M, van Zoelen, EJ, Yarden, Y: **The oncogenic ErbB-2/ErbB-3 heterodimer is a surrogate receptor of the epidermal growth factor and betacellulin.** *Oncogene*, 16(10), 1249 - 58, 1998
81. Plowman, GD, Whitney, GS, Neubauer, MG, Green, JM, McDonald, VL, Todaro, GJ, Shoyab, M: **Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene.** *Proc-Natl-Acad-Sci-USA*, 87(13), 4905 - 9, 1990
82. Plowman, GD, Green, JM, Culouscou, JM, Carlton, GW, Rothwell, VM, Buckley, S: **Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180erbB4.** *Nature*, 366, 473 - 475, 1993 a
83. Plowman, GD, Culouscou, JM, Whitney, GS, Green, JM, Carlton, GW, Foy, L, Neubauer, MG, Shoyab, M: **Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family.** *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A*, 90(5), 1746 - 50, 1993 b
84. Puri, RK, Debinski, W, Obiri, N, Kreitman, R, Pastan, I: **Human renal cell carcinoma cells are sensitive to the cytotoxic effect of a chimeric**

protein composed of human interleukin-4 and Pseudomonas exotoxin. *Cell-Immunol*, 154(1), 369 - 79, 1994

85. Puri, RK, Leland, P, Obiri, NI, Husain, SR, Mule, J, Pastan, I, Kreitman, RJ: **An improved circularly permuted interleukin 4-toxin is highly cytotoxic to human renal cell carcinoma cells. Introduction of gamma c chain in RCC cells does not improve sensitivity.** *Cell-Immunol*, 171(1), 80 - 6, 1996

86. Qian, Xiaolan, LeVea, CM, Freeman, JK, Dougall, WC, Greene, MI: **Heterodimerization of epidermal growth factor receptor and wild-type or kinase-deficient Neu: A mechanism of interreceptor kinase activation and transphosphorylation.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 1500 - 1504, 1994

87. Radinsky, R, Risin, S, Fan, XX, Dong, Z, Bielenberg, D, Bucana, CD, Fidler, IJ: **Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells.** *Clin Cancer Res*, 1, 19 - 31, 1995

88. Ramp, U, Jaquet, K, Reinecke, P, Schardt, C, Friebe, U, Nitsch, T, Marx, N, Gabbert, HE, Gerharz, CD: **Functional intactness of stimulatory and inhibitory autocrine loops in human renal carcinoma cell lines of the clear cell type.** *J-Urol*, 157(6), 2345 - 50, 1997

89. Reiter, Y, Brinkmann, U, Jung, SH, Lee, B, Kasprzyk, PG, King, CR, Pastan, I: **Improved binding and antitumor activity of a recombinant anti-erbB2 immunotoxin by disulfide stabilization of the Fv fragment.** *J-Biol-Chem*, 269(28), 18327 - 31, 1994 a

90. Reiter, Y, Brinkmann, U, Kreitman, RJ, Jung, SH, Lee, B, Pastan, I: **Stabilization of the Fv fragments in recombinant immunotoxins by**

disulfide bonds engineered into conserved framework regions. *Biochemistry*, 33(18), 5451 - 9, 1994 b

91. Reiter, Y, Brinkmann, U, Webber, KO, Jung, SH, Lee, B, Pastan, I: **Engineering interchain disulfide bonds into conserved framework regions of Fv fragments: improved biochemical characteristics of recombinant immunotoxins containing disulfide-stabilized Fv.** *Protein-Eng*, 7(5), 697 - 704, 1994 c

92. Reiter, Y, Kreitman, RJ, Brinkmann, U, Pastan, I: **Cytotoxic and antitumor activity of a recombinant immunotoxin composed of disulfide-stabilized anti-Tac Fv fragment and truncated Pseudomonas exotoxin.** *Int-J-Cancer*, 58(1), 142 - 9, 1994 d

93. Reiter, Y, Brinkmann, U, Jung, SH, Pastan, I, Lee, B: **Disulfide stabilization of antibody Fv: computer predictions and experimental evaluation.** *Protein-Eng*, 8(12), 1323 - 31, 1995

94. Reiter, Y, Wright, AF, Tonge, DW, Pastan, I: **Recombinant single-chain and disulfide-stabilized Fv-immunotoxins that cause complete regression of a human colon cancer xenograft in nude mice.** *Int-J-Cancer*, 67(1), 113 - 23, 1996

95. Riese (a), DJ, Bermingham, Y, van, RaaijTM, Buckley, S, Plowman, GD, Stern, DF: **Betacellulin activates the epidermal growth factor receptor and erbB-4, and induces cellular response patterns distinct from those stimulated by epidermal growth factor or neuregulin-beta.** *Oncogene*, 12(2), 345 - 53, 1996 a

96. Riese (b), DJ, Kim, ED, Elenius, K, Buckley, S, Klagsbrun, M, Plowman, GD, Stern, DF: **The epidermal growth factor receptor couples transforming growth factor-alpha, heparin-binding epidermal**

growth factor-like factor, and amphiregulin to Neu, ErbB-3, and ErbB-4. *J-Biol-Chem*, 271(33), 20047 - 52, 1996 b

97. Riese, DJ, Komurasaki, T, Plowman, GD, Stern, DF: Activation of ErbB4 by the bifunctional epidermal growth factor family hormone epiregulin is regulated by ErbB2. *J-Biol-Chem*, 273(18), 11288 - 94, 1998

98. Ronen, A, Broit, M, Nohturfft, A, Curry, J, Glickman, BW: Variable aberrant cDNAs in single diphtheria toxin-resistant human fibroblasts. *Mutat-Res*, 379(2), 109 - 15, 1997

99. Rotter, M, Block, T, Busch, R, Thanner, S, Hofler, H: Expression of HER-2/neu in renal-cell carcinoma. Correlation with histologic subtypes and differentiation. *Int-J-Cancer*, 52(2), 213 - 7, 1992

100. Ryazanov, AG, Shestakova, EA, Natapov, PG : Phosphorylation of elongation factor 2 by EF-2 kinase affects rate of translation. *Nature*, 334(6178), 170 - 3, 1988

101. Ryazanov, AG, Davydova, EK : Mechanism of elongation factor 2 (EF-2) inactivation upon phosphorylation. Phosphorylated EF-2 is unable to catalyze translocation. *FEBS-Lett*, 251(1-2), 187 - 90, 1989

102. Sargent, ER, Gomella, LG, Belldegrün, A, Linehan, WM, Kasid, A: Epidermal growth factor receptor gene expression in normal human kidney and renal cell carcinoma. *J Urol*, 142, 1364 - 1368, 1989

103. Shapiro, AL, Maizel Jr., JV : Molecular weight estimation for polypeptides. *Anal-Biochem*, 29, 505 - 514, 1969

104. Shelly, M, Pinkas, KramarskiR, Guarino, BC, Waterman, H, Wang, LM, Lyass, L, Alimandi, M, Kuo, A, Bacus, SS, Pierce, JH, Andrews, GC: Epiregulin is a potent pan-ErbB ligand that preferentially activates

heterodimeric receptor complexes. *J-Biol-Chem*, 273(17), 10496 - 505, 1998

105. Shukla, SK, Limouris, GS, Cusumano, R, Acconcia, A, Cipriani, C, Argiro, G, Atzei, G, Boemi, S: **Renal cell carcinoma detection and systemic therapy with tumour-affine gallium-67 and with yttrium-90 citrate solutions.** *Anticancer-Res*, 17(3B), 1713 - 8, 1997

106. Siegall, CB, Chaudhary, VK, FitzGerald, DJ, Pastan, I: **Functional analysis of domains II, Ib and III of Pseudomonas exotoxin.** *J Biol Chem*, 264, 14256 - 14261, 1989 a

107. Siegall, CB, Xu, YH, Chaudhary, VK, Adhya, S, Fitzgerald, D, Pastan, I: **Cytotoxic activities of a fusion protein comprised of TGF alpha and Pseudomonas exotoxin.** *FASEB-J*, 3(14), 2647 - 52, 1989 b

108. Slamon, DJ, Godolphin, W, Jones, LA, Holt, JA, Wong, SG, Keith, DE, Levin, WJ, Stuart, SG, Udove, J, Ullrich, A, Press, MF: **Studies of HER-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer.** *Science*, 244, 707 - 712, 1989

109. Sliwkowski, MX, Schaefer, G, Akita, RW, Lofgren, JA, Fitzpatrick, VD, Nuijens, A, Fendly, BM, Cerione, RA, Vandlen, RL, Carraway III, KL: **Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin.** *J-Biol-Chem*, 269(20), 14661 - 5, 1994

110. Soltoff, SP, Carraway, KL 3.rd, Prigent, SA, Gullick, WG, Cantley, LC: **ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor** *Mol Cell Biol*, 14, 3550 - 3558, 1994

111. Sorkin, A, Mazzotti, M, Sorkina, T, Scotto, L, Beguinot, L: **Epidermal growth factor receptor interaction with clathrin adaptors is mediated by the Tyr974-containing internalization motif.** *J-Biol-Chem*, 271(23), 13377 - 84, 1996

- 112.** Spaargaren, M, Defize, LH, Boonstra, J, de Laat SW: **Antibody-induced dimerization activates the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase.** *J-Biol-Chem*, 266(3), 1733 - 9, 1991
- 113.** Spivak, Kroizman T, Rotin, D, Pinchasi, D, Ullrich, A, Schlessinger, J, Lax, I: **Heterodimerization of c-erbB2 with different epidermal growth factor receptor mutants elicits stimulatory or inhibitory responses.** *J-Biol-Chem*, 267(12), 8056 - 63, 1992
- 114.** Stumm, G, Eberwin, S, Rostock-Wolf, S, Stein, H, Pomer, S, Schlegel, J, Waldherr, R: **Concomitant overexpression of the EGFR and ERBB-2 genes in renal cell carcinoma (RCC) is correlated with dedifferentiation and metastasis.** *Int J Cancer*, 69, 17 - 22, 1996
- 115.** Sunada, H, Magun, BE, Mendelsohn, J, Macleod, CL: **Monoclonal antibody against epidermal-growth-factor receptor is internalized without stimulating receptor phosphorylation** *Proc nat Acad Sci (Wash)*, 83, 3825 - 3829, 1986
- 116.** Sunada, H, Peacock, J, Mendelsohn, J : **Ligand induced internalization of epidermal growth factor receptors by A431 cells decreases at high cell densities in culture.** *Growth-Factors*, 5(1), 45 - 55, 1991
- 117.** Tiah, M, Ronen, A : **Autoradiographic detection of mutation to exotoxin-A resistance in mouse fibroblasts treated with ethyl methanesulfonate, X-rays and ultraviolet light.** *Mutat-Res*, 213(2), 205 - 15, 1989
- 118.** Tzahar, E, Pinkas, Kramarski R, Moyer, JD, Klapper, LN, Alroy, I, Levkowitz, G, Shelly, M, Henis, S, Eisenstein, M, Ratzkin, BJ, Sela, M: **Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network.** *EMBO-J*, 16(16), 4938 - 50, 1997

- 119.** Uhlman, DL, Nguyen, P, Manivel, JC, Zhang, G, Hagen, K, Fraley, E, Aeppli, D, Niehans, GA: **Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha expression in papillary and nonpapillary renal cell carcinoma: Correlation with metastatic behavior and prognosis.** *Clin Cancer Res*, 1, 913 - 920, 1995
- 120.** Ullrich, A, Schlessinger, J : **Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity.** *Cell*, 61, 203 - 212, 1990
- 121.** van-Delft, S, Schumacher, C, Hage, W, Verkleij, AJ, van, Bergenen HenegouwenPM: **Association and colocalization of Eps15 with adaptor protein-2 and clathrin.** *J-Cell-Biol*, 136(4), 811 - 21, 1997
- 122.** Veale, D, Kerr, N, Gibson, GJ, Kelly, PJ, Harris, AL: **The relationship of quantitative epidermal growth factor receptor expression in non-small cell lung cancer to long term survival.** *Brit J Cancer*, 68, 162 - 165, 1993
- 123.** Wada, T, Qian, XL, Greene, MI : **Intermolecular association of the p185neu protein and EGF receptor modulates EGF receptor function.** *Cell*, 61(7), 1339 - 47, 1990
- 124.** Wahl, MI, Carpenter, G : **Role of growth factors and their receptors in the control of normal cell proliferation and cancer.** *Clin-Physiol-Biochem*, 5(3-4), 130 - 9, 1987 a
- 125.** Wahl, MI, Sweatt, JD, Carpenter, G : **Epidermal growth factor (EGF) stimulates inositol trisphosphate formation in cells which overexpress the EGF receptor.** *Biochem-Biophys-Res-Commun*, 142(3), 688 - 95, 1987 b
- 126.** Walker, C : **Molecular genetics of renal carcinogenesis.** *Toxicol-Pathol*, 26(1), 113 - 20, 1998

- 127.** Wang, SD, Huang, KJ, Lin, YS, Lei, HY: **Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice.** *J-Immunol*, 152(10), 5014 - 21, 1994
- 128.** Wang, Z, Tung, PS, Moran, MF : **Association of p120 ras GAP with endocytic components and colocalization with epidermal growth factor (EGF) receptor in response to EGF stimulation.** *Cell-Growth-Differ*, 7(1), 123 - 33, 1996
- 129.** Weber, K, Osborn, M : **The reliability of molecular weight determinators by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.** *J. Biol. Chem.*, 224, 4406 - 4412, 1969
- 130.** Weidner, U, Peter, S, Strohmeyer, T, Hussnatter, R, Ackermann, R, Sies, H: **Inverse relationship of epidermal growth factor receptor and HER2/neu gene expression in human renal cell carcinoma.** *Cancer-Res*, 50(15), 4504 - 9, 1990
- 131.** Weisser, M, Tiegs, G, Wendel, A, Uhlig, S: **Quantification of apoptotic and lytic cell death by video microscopy in combination with artificial neural networks.** *Cytometry*, 31(1), 20 - 8, 1998
- 132.** Wels, W, Harwerth, IM, Mueller, M, Groner, B, Hynes, NE: **Selective inhibition of tumor cell growth by a recombinant single-chain antibody-toxin specific for the ERBB-2 receptor.** *Cancer Res*, 52, 6310 - 6317, 1992 a
- 133.** Wels, W, Harwerth, IM, Hynes, NE, Groner, B: **Diminution of antibodies directed against tumor cell surface epitopes: a single chain Fv fusion molecule specifically recognizes the extracellular domain of the c-ERBB-2 receptor.** *J-Steroid-Biochem-Mol-Biol*, 43(1-3), 1 - 7, 1992 b
- 134.** Wels, W, Beerli, R, Hellmann, P, Schmidt, M, Marte, BM, Kornilova, ES, Hekele, A, Mendelsohn, J, Groner, B, Hynes, NE, Hynes, NE: **EGF**

receptor and p185ERBB-2-specific single-chain antibody toxins differ in their cell-killing activity on tumor cells expressing both receptor proteins. *Int J Cancer*, 60, 137 - 144, 1995

135. Wolk, A, Lindblad, P, Adami, HO : **Nutrition and renal cell cancer.** *Cancer Causes Control*, 7(1), 5 - 18, 1996 a

136. Wolk, A, Gridley, G, Niwa, S, Lindblad, P, McCredie, M, Mellempgaard, A, Mandel, JS, Wahrendorf, J, McLaughlin, JK, Adami, HO: **International renal cell cancer study. VII. Role of diet.** *Int J Cancer*, 65(1), 67 - 73, 1996 b

137. Yuan, JM, Gago, DominguezM, Castelao, JE, Hankin, JH, Ross, RK, Yu, MC: **Cruciferous vegetables in relation to renal cell carcinoma.** *Int-J-Cancer*, 77(2), 211 - 6, 1998

9 Lebenslauf

	Adrian Gerhard Grund
<u>GEBURTSTAG:</u>	5. Januar 1972
<u>GEBURTSORT:</u>	Malapane / Oberschlesien
<u>FAMILIENSTAND:</u>	ledig
<u>STAATSANGEHÖRIGKEIT:</u>	deutsch
 <u>BILDUNGSWEG:</u>	
8/78 - 7/82	Besuch der Grundschule
8/82 - 10/87	Besuch des Helene-Lange-Gymnasiums in Düsseldorf
10/87- 6/91	Besuch des Annette-von-Droste-Hülshoff- Gymnasiums in Düsseldorf
6/91	Allgemeine Hochschulreife
7/91 -9/92	Zivildienst in der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie der Heinrich – Heine - Universität Düsseldorf
10/92	Beginn des Humanmedizinstudiums an der Heinrich - Heine - Universität in Düs- seldorf
9/94	Ärztliche Vorprüfung
9/95	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
9/97	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/98	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1.06.2000	Erteilung der Approbation als Arzt

Klinische Tätigkeit:

- 01.12. 98 - 30.12.99** Innere Medizin im Marienhospital Mülheim
a.d. Ruhr bei Herrn Prof. Dr. König als
AIP
- 01.12.99 - 31.05.00** Innere Medizin im Krankenhaus der
Barmherzigen Brüder in München bei
Herrn Prof. Dr. Wechsler als AIP
- seit 1.06.2000** Assistenzarzt im Krankenhaus der
Barmherzigen Brüder in München in der
Inneren Medizin

Adrian Grund

Zusammenfassung der Arbeit

Für das metastasierende Nierenzellkarzinom existiert zum gegenwärtigen Zeitpunkt kein etabliertes Therapieschema. In Anbetracht der schlechten chirurgischen Therapiemöglichkeiten, ihrer hohen Strahlenresistenz und bisher nur minimaler Erfolge in der konventionellen Chemotherapie sollte mit der vorliegenden Arbeit in in vitro-Versuchen die Empfindlichkeit menschlicher Nierenzellkarzinomzelllinien gegenüber den rekombinanten Toxinen scFv(FRP5)-ETA, scFv(225)-ETA und TGF- α -ETA untersucht werden, die an den EGF-Rezeptor oder ERBB-2-Rezeptor an der Zellmembran binden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß viele Nierenzellkarzinome - unabhängig von ihrem histologischen Typ - auf die untersuchten rekombinanten Toxine mit einer signifikanten Reduktion ihrer Zellzahl reagieren, die wahrscheinlich nicht nur auf eine Zellwachstumshemmung, sondern gleichzeitig auf einen vermehrten Zelluntergang über die Induktion von Apoptose durch die Toxine zurückzuführen ist.

Rekombinante Toxine könnten deshalb Chancen in der Therapie metastasierender Nierenzellkarzinome bieten. Da die Bestimmung der Rezeptordichte keine Vorhersagen zum Ansprechen der Tumoren auf eine Exposition gegenüber rekombinanten Toxinen erlaubt, müßte überprüft werden, ob vor einem klinischen Einsatz der Toxine in Kurzzeitkulturen die individuelle Empfänglichkeit eines Tumors bestimmt werden kann. Denkbar wäre auch der adjuvante Einsatz von rekombinanten Toxinen nach chirurgischer Intervention zur Zellwachstumshemmung einzelner Tumorzellen bzw. Mikrometastasen.

(Prof. Dr. C. D. Gerharz)

(A. G. Grund)