

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

**Charakterisierung und funktionelle Analyse des TRAIL-
Systems und der Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP)
Familie in humanen Neoplasien**

Dissertation

zur Erlangung der Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Andreas Krieg

2005

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: Univ.-Prof. Dr. Gerharz

Korreferent: Prof. Dr. Schulz

Meinen Eltern und Yvonne gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
I.1	Das humane Nierenzellkarzinom	1
I.2.	Die Bedeutung des programmierten Zelltodes in eukaryotischen Zellen	3
I.3.	Die Signalwege des programmierten Zelltodes	5
I.3.1	Die Rolle der Mitochondrien im Rahmen des programmierten Zelltodes	5
I.3.2	Die zentrale Rolle von Todesrezeptoren in der Regulierung des programmierten Zelltodes	6
I.3.3	Das TRAIL-System	7
I.3.4	Caspasen: Vermittler apoptotischer Signale	10
I.4	NF- κ B: Gegenspieler apoptotischer Signalwege	11
I.5	Apoptoseinhibitoren: Die IAP-Familie und ihre Rolle in humanen Karzinomen	15
I.5.1	Die IAP-Familie: struktureller Aufbau und Mechanismen der Apoptoseinhibition	15
I.5.2	Survivin: ein Apoptoseinhibitor mit zellzyklusregulierendem Einfluß	16
I.6	Aufgabenstellung und Zielsetzung	19
II.	MATERIAL UND METHODEN	20
II.1	Material	20
II.2	Methoden	32
II.2.1	Kultivierung von Zellen	32
II.2.2	Bestimmung der Lebendzellzahl	32
II.2.3	Zytostatika- und Zytokin- Behandlung von adhärenenten Zellen	33
II.2.4	Isolierung, Kultivierung und Stimulierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes	33
II.2.5	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäure	34
II.2.6	Modifizierung von Nukleinsäuren	35

II.2.7	Präzipitation von Nukleinsäuren	36
II.2.8	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	36
II.2.9	DNA-Sequenzierung	36
II.2.10	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	37
II.2.11	Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen	37
II.2.12	Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion	38
II.2.13	Transfektion von eukaryotischen Zellen über Lipofektion	39
II.2.14	Proteinchemische Methoden	40
II.2.15	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	41
III.	ERGEBNISSE	42
III.1	Das TRAIL-System im Nierenzellkarzinom	42
III.2	Zytostatika und Zytokine im Nierenzellkarzinom	60
III.3	Die Rolle von Survivin in humanen malignen Tumoren	68
III.4	Die mRNA-Expression von Survivin, Survivin- Δ Ex3 und Survivin-2B in humanen, mononukleären Zellen des peripheren Blutes	86
IV.	DISKUSSION	91
IV.1	Das TRAIL-System im Nierenzellkarzinom	91
IV.1.1	Die Expression des TRAIL-Systems	91
IV.1.2	Die Entdeckung alternativer Spleißvorgänge im TRAIL-System	92
IV.1.3	Hypothesen zur Funktion der alternativen Spleißvarianten von TRAIL und DcR2	93
IV.2	Die Bedeutung der IAP-Familie im Nierenzellkarzinom	95
IV.2.1	Die Rolle der IAPs im Rahmen einer Sensitivierung der TRAIL-induzierten Apoptose in Nierenkarzinom-Zelllinien durch Topotecan	95
IV.2.2	Die Bedeutung der IAP-Familie im Nierenzellkarzinom und mononukleären Zellen des peripheren Blutes	98
IV.2.2.1	Die stadienabhängige Expression von Survivin und seinen beiden alternativen Spleißvarianten in humanen Neoplasien	98
IV.2.2.2	Die Expression der IAP-Familie in peripheren Blutzellen des mononukleären Systems	101

V.	ZUSAMMENFASSUNG	103
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	105

I. EINLEITUNG

I.1 Das humane Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom (*engl.: renal cell carcinoma, RCC*) ist ein maligner, epithelialer Tumor des Nierenparenchyms, der histogenetische Merkmale von Tubulusepithelien aufweist. Nierenzellkarzinome machen beim Erwachsenen 85 % aller bösartigen neoplastischen Läsionen der Niere und ca. 3 % aller malignen Geschwülste des Menschen aus. Jährlich werden 5 neue Erkrankungsfälle pro 100.000 Einwohner registriert, wobei Männer doppelt so häufig betroffen sind wie Frauen. Meist tritt das Nierenzellkarzinom sporadisch auf. Daneben wird selten auch eine familiäre Häufung beobachtet, wie bei der autosomal dominant vererbten von-Hippel-Lindau Erkrankung, bei der ein Defekt des VHL-Tumorsuppressorgens auf Chromosom 3 vorliegt (NEUMANN et al. 1998), und der tuberösen Sklerose (TORRES et al. 1997). Die sporadisch auftretenden Erkrankungen manifestieren sich in der Regel in einem höheren Lebensalter (Häufigkeitsmaximum: 5.-7.Lebensdekade), während der Manifestationsgipfel der familiären Formen im jüngeren Erwachsenenalter zu finden ist. Die kausale Pathogenese der Tumorentstehung des RCC ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch scheinen Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Adipositas oder Amphetaminabusus prädisponierende Faktoren darzustellen (YUAN et al. 1998, HEATH et al. 1997).

Histologisch werden ein klarzelliger Typ von einem chromophilen/papillären und chromophoben Typ (THOENES et al. 1986) unterschieden. Der klarzellige Typ, der sich aus Zellen des proximalen Tubulus ableitet, die ein glykogenhaltiges Zytoplasma mit pflanzenzellartigem Aspekt aufweisen, zeigt bevorzugt ein solides Wachstumsmuster und stellt mit 80 % den häufigsten Nierenkarzinomtyp dar (THOENES et al. 1986). Demgegenüber wachsen die Tumoren vom chromophilen Typ, die ebenfalls Merkmale proximaler Tubulusepithelien aufweisen, hauptsächlich in tubulopapillärem Muster und machen 10 % aller RCCs aus. Die sich von Zellen der Sammelrohrsaltstücke ableitenden chromophoben Nierenzellkarzinome (5 % aller RCCs) zeigen ein solides Wachstumsmuster und setzen sich aus Zellen mit transparentem, feinretikulärem Zytoplasma zusammen.

Nach den Vorgaben der UICC (UNION INTERNATIONALE CONTRE LA CANCER, TNM-Klassifikation maligner Tumoren) und der WHO erfolgt die Einteilung der Nierenzellkarzinome anhand der TNM-Klassifikation wie folgt:

-
- pT1 Tumor $\leq 7,0$ cm, begrenzt auf Niere
 - pT2 Tumor $> 7,0$ cm, begrenzt auf Niere
 - pT3 Tumorinfiltration innerhalb der Gerota-Faszie, makroskopischer Veneneinbruch, Infiltration der Nebenniere oder des perirenal Gewebes
 - pT4 Tumorinvasion über Gerota-Faszie hinaus

 - pN1 solitäre Lymphknotenmetastase in einem regionären Lymphknoten
 - pN2 Metastase in mehr als einem regionären Lymphknoten

 - pM0 keine Fernmetastasen
 - pM1 Fernmetastasen

Das Nierenzellkarzinom metastasiert bevorzugt hämatogen nach dem Kavotyp in Lunge (50 %), Leber (30 %), Skelettsystem (30 %), Gehirn und in die kontralaterale Niere, aber auch lymphogen (35 %). Die Anzahl der inzidentell diagnostizierten Tumore mit niedrigem Tumorstadien hat in den letzten Jahren aufgrund der größeren Verfügbarkeit von Sonographie und Computertomographie gegenüber metastasierten und fortgeschrittenen Tumoren zugenommen (JAYSON et al. 1998). Die Therapie der Wahl des lokalisierten Nierenzellkarzinoms besteht in der radikalen Nephrektomie. Dagegen wird die systemische Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms durch seine hohe Resistenz gegenüber einer konventionellen Strahlen-, Chemo- und Immuntherapie kompliziert. Diese beruht unter anderem auf dem *Multidrug Resistance (mdr I)-Phänotyp*. Durch diesen Phänotyp kommt es zur Überexpression des P-Glykoproteins 170 (pgp170), einer Calcium-getriggerten Pumpe, die die intrazelluläre Konzentration angefluteter Zytostatika verringert, bevor sie intrazellulär ihre Wirkung entfalten (BALDINI et al. 1997, MULDER et al. 1997). Jedoch zeigen Ergebnisse erster Therapieansätze mit pgp170-Inhibitoren, daß dieser Vorgang durch weitere Mechanismen, die eine Resistenz gegenüber Zytostatika induzieren, möglicherweise potenziert wird. Eine entscheidende Rolle können dabei regulatorische Defekte im Apoptosesignalweg oder die Überexpression von Apoptoseinhibitoren spielen (MAHOTKA et al. 2002, SCHELTEMA et al. 2001, SCHOENFELD et al. 2001, MAHOTKA et al. 2000, TSUJIMOTO et al. 1985, ADAMS et al. 1998).

Zur Zeit erfolgt daher die Therapie des metastasierten RCC lediglich mit Interferon alpha 2a, Interleukin-2 oder in Form einer Kombination beider Substanzen (NEGRIER et al. 1998).

I.2. Die Bedeutung des programmierten Zelltodes in eukaryotischen Zellen

Der programmierte Zelltod, auch unter der Bezeichnung *Apoptose* bekannt, ist ein physiologischer Prozeß, der für die Entwicklung und Homöostase eukaryotischer Organismen von zentraler biologischer Bedeutung ist (KERR et al. 1972). So ist der programmierte Zelltod schon während der Embryogenese an Differenzierungsvorgängen beteiligt. Als Beispiel sei die Rückbildung der Interdigitalfalten der sich entwickelnden Hand erwähnt (GARCIA-MARTINEZ et al. 1993). Dabei sterben Zellen, die für die weitere Entwicklung und Differenzierung keine Verwendung finden durch ein zelluläres, aktiv kontrolliertes „Suizidprogramm“ ab. Im Rahmen der Gewebekomöostase sorgt der programmierte Zelltod für die Elimination genetisch defekter oder gealterter Zellen, die durch neue Zellen ersetzt werden. Die oberen Zellschichten der Haut werden ständig durch den Prozeß der Apoptose eliminiert und durch Zellen aus tieferen Schichten ersetzt (KERR et al. 1972). Auch im Rahmen immunologischer Prozesse kommt dem programmierten Zelltod eine weitere bedeutende Funktion zu. Hier werden autoreaktive Lymphozyten, die während der lymphatischen Differenzierung entstehen, durch apoptotische Signale eliminiert (RATHMELL et al. 1995). Daher ist es kaum verwunderlich, daß Deregulationen im programmierten Zelltod pathogenetisch von zentraler Bedeutung für eine Reihe von humanen Erkrankungen sind (CARSON et al. 1993, THOMPSON et al. 1995): Beispielsweise kann die fehlende apoptotische Elimination genetisch defekter Zellen zur weiteren Akkumulation transformierender Mutationen führen und Wegbereiter humaner Neoplasien sein. Solch eine verminderte Apoptosefrequenz findet sich auch bei Autoimmunkrankheiten (O'REILLY et al. 1999). Eine gesteigerte Apoptosefrequenz findet sich hingegen bei neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Alzheimer und M. Parkinson (MATTSON et al. 2000), aber auch bei der HIV-induzierten AIDS-Krankheit (ROSHAL et al. 2001, SELLIAH et al. 2001).

Das morphologische Korrelat der Apoptose ist die „*Schrumpfnekrose*“ und wurde erstmals von KERR et al. (1972) beschrieben (**Abb.1.1**). Ist der Prozeß der Apoptose in Gang gesetzt, kommt es zu charakteristischen morphologischen Veränderungen, deren korrespondierende Mechanismen auf biochemischer Ebene nur teilweise geklärt sind. Adhärente Zellen runden sich ab und verlieren den Kontakt zu ihren Nachbarzellen, wenn sie apoptotisch werden. Es

folgt das Schrumpfen der Zellen, wobei das Chromatin kondensiert und die Zellmembran durch Veränderung des Zytoskellets zahlreiche Bläschen bildet (*blebbing*). Es kommt zur Auflösung der Kernmembran sowie zur Fragmentierung des Zellkerns und unweigerlich werden die Kerntrümmer in Form von membranumschlossenen Körperchen (*apoptotic bodies*) abgeschnürt. Zur Stabilität der *apoptotic bodies* trägt die Gewebetransglutaminase bei; sie katalysiert die Vernetzung von Proteinen (FESUS et al. 1993, GENTILE et al. 1992). Durch die Exposition von Membranphospholipiden (z.B. Phosphatidylserin) an der Zelloberfläche wird die sterbende Zelle für Makrophagen erkennbar und schließlich phagozytiert (SAMBRANO et al. 1995).

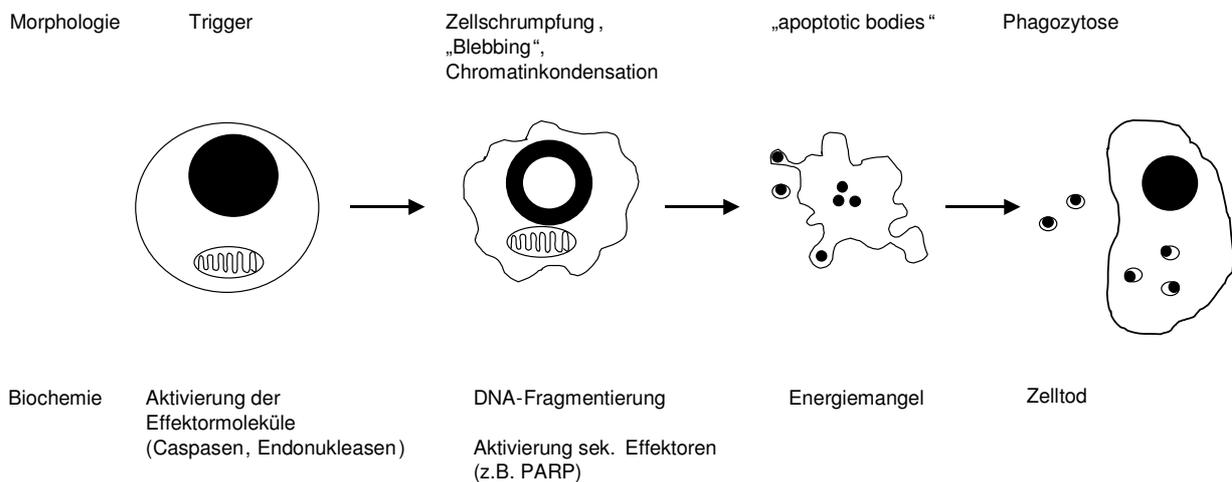


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen während des programmierten Zelltodes.

Im Gegensatz zur Nekrose, der zweiten Form des Zelltodes, verläuft die Apoptose als aktiv durch Signalkaskaden regulierter und kontrollierter Prozeß und wird nicht von einer begleitenden inflammatorischen Reaktion potenziert. Ferner ist ein weiteres Merkmal des programmierten Zelltodes die Integrität der Zellmembran. Sie wird im Rahmen der Nekrose meist geschädigt und begünstigt durch Verlust ihrer Barrierefunktion das Eindringen von Flüssigkeit, was zum charakteristischen Anschwellen der nekrotischen Zellen durch Membranschädigungen (osmotische Lyse) führt. Die Nekrose wird durch die Einwirkung exogener oder endogener Noxen (z.B. Verätzungen, Proteasen bei Pankreatitis) ausgelöst, die

zum Anschwellen und Zerplatzen der betroffenen Zelle führt und durch Freisetzung lysosomaler Enzyme eine inflammatorische Immunantwort auslöst, die anschließend durch Reparationsvorgänge ersetzt wird.

I.3. Die Signalwege des programmierten Zelltodes

Der Verlauf des programmierten Zelltodes kann in drei Phasen eingeteilt werden: die *Induktionsphase*, in der die Zielzelle die spezifischen Zelltod-auslösenden Signale empfängt, eine *Effektorphase*, während der der zentrale Mechanismus des Zelltodes eingeleitet wird und die Zelle gegenüber dem Tod empfänglich wird sowie eine *Degradationsphase*, während der die Zelle die charakteristischen morphologischen und biochemischen Merkmale der Apoptose entwickelt. Beim Durchlauf dieser Phasen wird ein Punkt (*point of no return*) erreicht, an dem es unwiderruflich zum Zelltod kommt. Biochemisch können zwei Wege durchlaufen werden, an deren Ende der programmierte Zelltod steht: So kann auf der einen Seite der Weg über die rezeptorvermittelte Aktivierung einer Kaskade aus Cystein-Proteasen, den Caspasen, verlaufen (sog. Typ I-Apoptose), zum anderen kann der Verlust der mitochondrialen Membranbarriere mit konsekutivem Öffnen von Kanälen durch verschiedene Stimuli wie UV-Exposition, Caspase-8-Spaltung (sog. Typ II-Apoptose), Ceramid, Ca^{2+} oder Zytostatika die Apoptose einleiten (JURGENSMEIER et al. 1998, GREEN et al. 1998).

I.3.1 Die Rolle der Mitochondrien im Rahmen des programmierten Zelltodes

Verschiedene Faktoren wie γ - und UV-Strahlung, Ca^{2+} , Oxidantien, Ceramid oder eine Bax - Überexpression führen über die Öffnung der PT-Pore (*permeability transition pore*), eines Ionenkanals, der die innere und äußere mitochondriale Membran durchzieht (ZORATTI et al. 1995, KINALLY et al. 1996, BERNARDI et al. 1996, HIRSCH et al. 1997, KROEMER et al. 1997), zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$. Dadurch kommt es zur Freisetzung Caspase-aktivierender Proteine, wie z.B. von Cytochrom c, aus dem intermembranären Raum in das Zytoplasma (QIAN et al. 1997, GREEN et al. 1998). Gleichzeitig kann die Öffnung dieser Kanäle aufgrund der Hyperosmolarität der mitochondrialen Matrix eine Erhöhung des intramitochondrialen Volumens bewirken. Es kommt zur Matrixschwellung und letztendlich zur Ruptur der äußeren Membran, die eine kleinere Oberfläche aufweist als die gefaltete innere Membran (CHERNYAK et al. 1997,

VANDER HEIDEN et al. 1997). Auf diese Weise können neben Cytochrom c weitere Caspase-Aktivatoren und intramitochondrial gelegene Caspasen freigesetzt werden (SUSIN et al. 1999, SUSIN et al. 1999). Cytochrom c bindet im Zytosol an den *apoptotic protease activating factor* Apaf1. Es folgt über seine *caspase recruitment domain* (CARD) die Assoziation mit der Procaspase-9. Durch diesen als Apoptosom bezeichneten Komplex wird Caspase-9 aktiviert und nachfolgend über die Kaskade der Caspasen die Apoptose initiiert (LI et al. 1997, SLEE et al. 1999). Ferner führt die Freisetzung von Cytochrom c über den Zusammenbruch des mitochondrialen Elektronentransportes zum Verlust der oxidativen Phosphorylierung und damit zum Absinken energiereicher ATPs sowie zur Veränderung des mitochondrialen pH-Wertes (GREEN et al. 1998). Neben der Caspase-abhängigen Form des programmierten Zelltodes existiert eine Caspase-unabhängige Variante, die durch eine Alteration der Mitochondrienmembran und -funktion in Gang gesetzt wird. Diese Form der Apoptose verläuft in der Regel langsamer und ohne die typischen morphologischen Veränderungen. Dabei kommt es zur Freisetzung von mitochondrialen Proteinen wie AIF (*apoptosis inducing factor*) (LORENZO et al. 1999, SUSIN et al. 1999). Beispiele für die Caspasen-unabhängige Apoptoseinduktion sind der Zelltod von Thymocyten und lymphatischen Zelllinien durch Glukokortikoide (HIRSCH et al. 1997, BRUNET et al. 1998), der Zelltod durch Ceramide (LESAGE et al. 1997) sowie die Apoptose haematopoetischer Zellen durch Wachstumsfaktoren (HIRSCH et al. 1997, AMARANTE-MENDES et al. 1998, MCCARTHY et al. 1997).

I.3.2 Die zentrale Rolle von Todesrezeptoren in der Regulierung des programmierten Zelltodes

Ein weiterer Mechanismus, der an der Regulation von Zelltod, Zellproliferation und Differenzierung beteiligt ist, wird durch Oberflächenrezeptoren und ihre korrespondierenden Liganden vermittelt. Zu dieser Gruppe gehören zahlreiche strukturell verwandte Moleküle, die zur *Tumor necrosis factor* (TNF)-Rezeptor Superfamilie zusammengefaßt werden. Dabei handelt es sich um Typ-I-Transmembranproteine, wie den CD95-Rezeptor, TNF-R1 (p55), TNF-R2 (p75), TNF-R3, NGF-R, CD27, CD30, CD40, OX-40, TRAMP (DR3/APO-3/LARD, wsl-1) RANK und die TRAIL-Rezeptoren DR4, DR5, DcR1 und DcR2. Sie zeichnen sich alle dadurch aus, daß ihr extrazellulärer Bereich aus hoch konservierten *cysteinreichen Domänen* (CRD) aufgebaut ist. Fünf dieser Rezeptoren (TNF-R1, CD95, TRAMP, DR4, DR5) weisen eine aus 80 Aminosäuren zusammengesetzte, intrazelluläre Region hoher Homologie auf. Sie ermöglicht es, cytotoxische Signale weiterzuleiten und wird daher als *death domain* (DD)

bezeichnet. Aufgrund ihrer Todesdomäne haben diese Rezeptoren auch die Bezeichnung „Todesrezeptoren“ erhalten (ITO et al. 1993, TARTAGLIA et al. 1993).

Die Aktivierung der Todesrezeptoren erfolgt durch Bindung ihrer korrespondierenden, meist homotrimerisierten Liganden, die der Familie der TNF-Cytokine zugerechnet werden. Diese Liganden, zu denen CD95-L, TNF, Lymphotoxin- α (LT α) und TRAIL gerechnet werden, sind meist Typ-II-Membranproteine und weisen ebenfalls hohe strukturelle Ähnlichkeiten auf. Die Liganden werden als membrangebundene Moleküle synthetisiert, können jedoch durch spezifische Metalloproteinasen aus ihrer membranären Form entlassen werden (MARIANI et al. 1995, WILLMROTH et al. 1998). Durch die Ligandenbindung an den korrespondierenden Rezeptoren bilden sich membrangebundene Komplexe aus. Zur Stabilität der Liganden-Rezeptor-Komplexe tragen Disulfidbrückenbindungen zwischen den Cysteinresten der CRDs bei (BANNER et al. 1993).

I.3.3 Das TRAIL-System

Eine besondere Bedeutung unter den Mitgliedern der TNF-Familie kommt dem TRAIL-System zu, da es neben den beiden agonistischen, Apoptose-induzierenden TRAIL-Rezeptoren vom Typ 1 (TRAIL-R1/DR4) und 2 (TRAIL-R2/DR5/TRICK2/KILLER), durch zwei weitere jedoch antagonistische, Apoptose-inhibierende Rezeptoren, die TRAIL-Rezeptoren vom Typ 3 (TRAIL-R3/DcR1/TRID/LIT) und 4 (TRAIL-R4/DcR2/TRUNDD) ergänzt wird (**Abb. 1.2**) (DEGLI ESPOSTI et al. 1997).

Der korrespondierende Ligand für diese Rezeptoren wurde von PITTI et al. (1996) identifiziert und aufgrund seiner hohen Homologie zur TNF-Cytokin-Familie als *TNF related apoptosis inducing ligand* (TRAIL/Apo2L) bezeichnet. Strukturell setzt sich TRAIL aus einer kurzen 17 Aminosäuren langen intrazellulären Domäne, einem transmembranären Bereich aus 16 Aminosäuren und einem extrazellulären Bereich (248 AS) zusammen. Jüngste Arbeiten konnten zeigen, daß die Aminosäure Cystein in Position 230 für die Trimerisierung des löslichen Liganden und damit für das apoptotische Potential notwendig ist (TRABZUNI et al., 2000; BODMER et al., 2000; SEOL et al., 2000).

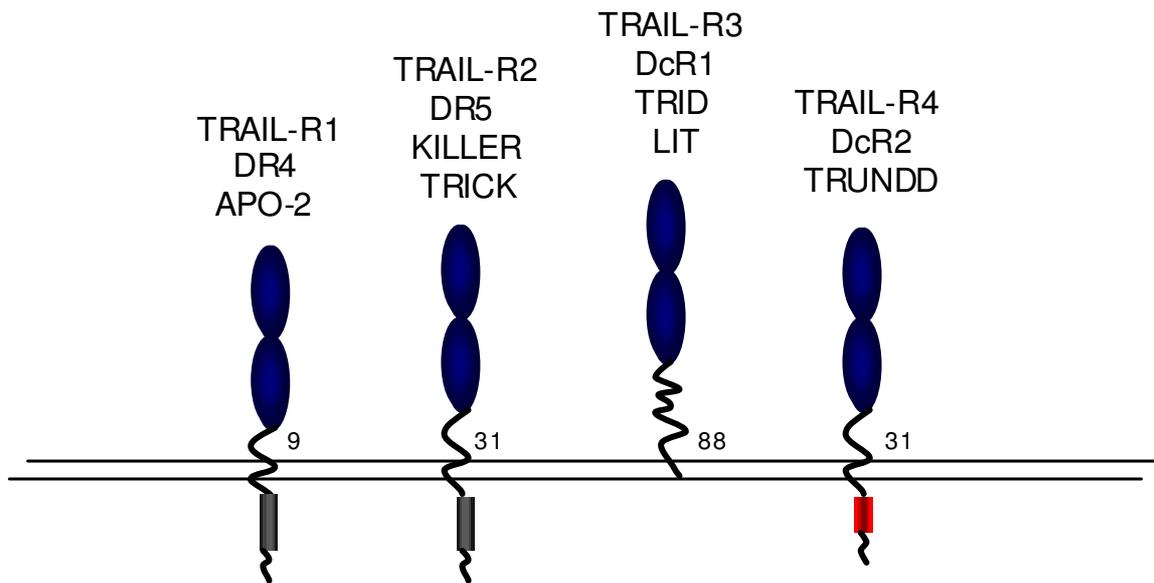


Abb. 1.2 : Die Rezeptoren des TRAIL-Systems. Grau dargestellt ist die intrazelluläre Todesdomäne, rot gefärbt ist die truncierte Todesdomäne des TRAIL-Rezeptors 4.

TRAIL-R1 und -R2 sind strukturell hoch homolog und setzen sich aus einem extrazellulären Bereich mit zwei cysteinreichen Domänen, einer transmembranären Region und einem intrazellulären Bereich, der die 76 Aminosäuren lange Todesdomäne (*Death Domain*) trägt, zusammen. Für den Todesrezeptor TRAIL-R2 konnte eine alternative Spleißvariante charakterisiert werden, die durch die Prozessierung im Bereich von Exon 5 zustande kommt. Nach Bindung der TRAIL-Homotrimere kommt es zu einer Trimerisierung der Rezeptoren, die konsekutiv zur Aktivierung der Caspasen-abhängigen Form des programmierten Zelltodes führt (MONGKOLSPAYA et al. 1999). Die Signalweitergabe vom aktivierten Todesrezeptor zur Caspase-Kaskade ist noch nicht vollständig geklärt und wird kontrovers diskutiert. So konnte anfänglich gezeigt werden, daß weder TRAIL-R1 noch TRAIL-R2 zur Signaltransduktion auf eine Interaktion mit dem Adaptermolekül FADD (*Fas-associated death domain*) angewiesen sind und eine dominant negative Form von FADD (DN-FADD) die TRAIL-vermittelte Apoptose nicht beeinflusst (PAN et al., 1997; SHERIDAN et al., 1997; MACFARLANE et al., 1997). Dagegen zeigten andere Arbeiten (WALCZAK et al., 1997; CHAUDHARY et al., 1997; SCHNEIDER et al. 1997, WAJANT et al., 1998; BODMER et al., 2000), daß eine Überexpression an *dominant-negativem-FADD* das TRAIL-vermittelte Apoptosesignal über die TRAIL-Todesrezeptoren unterbricht. So zeigten CHAUDHARY et al. und SCHNEIDER et al. ferner, daß

TRAIL-R1 und -R2 wie der TNF-Rezeptor 1 über die Interaktion ihrer Todesdomäne mit der Todesdomäne von TRADD (= *TNF-receptor associated death domain*) FADD rekrutieren. Dieser als DISC (*death inducing signaling complex*) bezeichnete Komplex induziert über nachfolgende Caspase-8- (FLICE/MACH) Aktivierung den programmierten Zelltod. Weiterhin beschrieben sie die NF- κ B-Induktion über eine indirekte Rekrutierung von TRAF2 über RIP (= *receptor-interacting protein*) oder TRADD an den TRAIL-Todesrezeptoren. Ein weiterer TRAIL-vermittelter, jedoch FADD-unabhängiger Signalweg, führt zelltypspezifisch, abhängig oder unabhängig von Caspasen, zur Aktivierung der c-Jun NH₂-terminalen Kinase (JNK) (MUHLENBECK et al., 1998; HERR et al., 1999). Welche Bedeutung diesem Signalweg über das TRAIL-System zukommt, bedarf weitere Untersuchungen. Die neutralisierenden TRAIL-Rezeptoren vom Typ 3 (TRAIL-R3/DcR1) und 4 (TRAIL-R4/DcR2) werden als Decoy-(Fänger) Rezeptoren bezeichnet, da sie keine funktionelle intrazelluläre Todesdomäne aufweisen. TRAIL-R3 weist keine intrazelluläre Domäne auf, so daß dieser Rezeptor lediglich über eine Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Bindung in der Zellmembran verankert ist (DEGLI ESPOSTI et al. 1997), während TRAIL-R4 eine trunkeierte Todesdomäne von 52 Aminosäuren aufweist, die den Rezeptor lediglich noch zur NF- κ B-Aktivierung befähigt (DEGLI ESPOSTI et al. 1997). In **Abbildung 1.3** sind die Signalwege der TRAIL-Rezeptoren dargestellt.

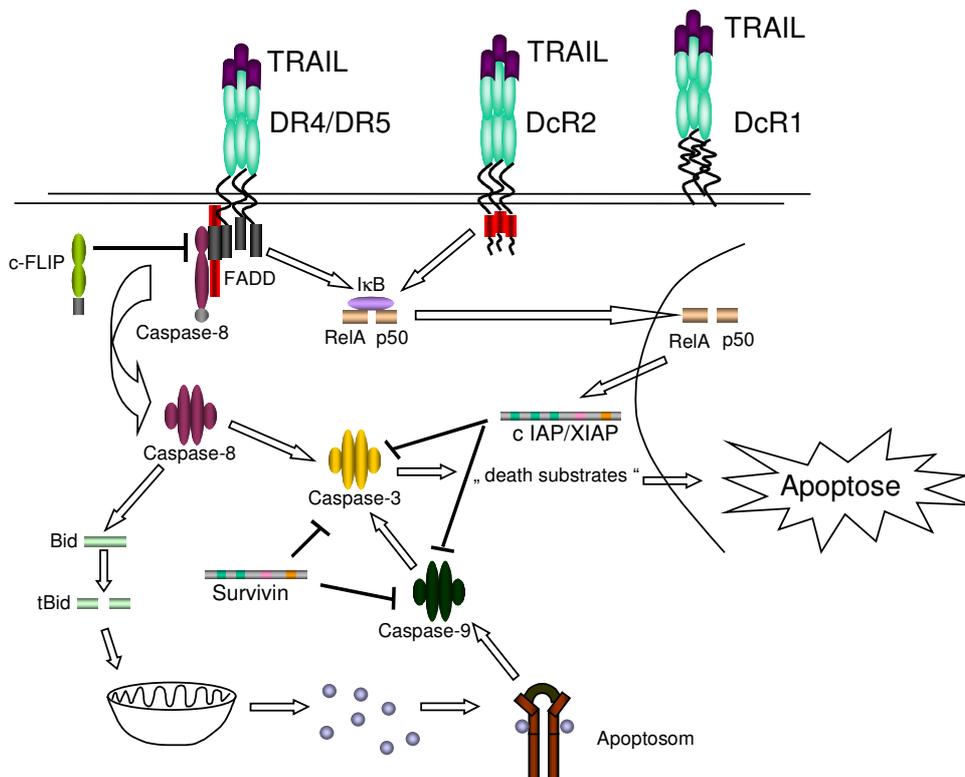


Abb. 1.3 : Signalwege der TRAIL-Rezeptoren.

I.3.4 Caspasen: Vermittler apoptotischer Signale

Als Folge der Todesrezeptor-Aktivierung wird eine Kaskade von Proteasen, sogenannten Caspasen (*cysteine-rich aspartate proteases*), aktiviert. Bislang konnten in Säugetieren 13 Caspasen identifiziert werden, die als Initiator (Caspase-2, -8, -9 und -10) oder als Effektor (Caspase-3, -6 und -7) im Apoptosesignalweg, aber auch in inflammatorischen Prozessen (Caspase-1 und -11) eine entscheidende Rolle spielen. Aufgrund ihrer Substratspezifität und Sequenzhomologie können die Caspasen in zwei Untergruppen eingeteilt werden: Zum einen in die Gruppe der ICE-ähnlichen Proteasen, zu denen die Caspasen-1, -4, -5, -11, -12, -13 und -14 gerechnet werden, und in die Gruppe der CED-3-ähnlichen Proteasen, der die Caspasen-2, -3, -6, -8, -9 und -10 zugeordnet werden (THORNBERRY et al 1998). Neben der hohen Sequenzhomologie und Substratspezifität ist den Caspasen ihre Expression als inaktives 30-50 kD großes Proenzym gemeinsam, das aus einer NH₂-terminalen Prodomäne, einer großen Untereinheit (~ 20 kD) und einer kleinen Untereinheit (~ 10 kD) zusammengesetzt ist. Die Aktivierung dieser Proenzyme erfolgt durch proteolytische Spaltung zwischen den Domänen, so daß die kleine und große Untereinheit ein Heterodimer formen können. Wie kristallographische Untersuchungen an zwei aktiven Caspasen (Caspase-1 und -3) zeigen konnten, bilden zwei aktive Heterodimere ein Tetramer mit zwei unabhängig voneinander agierenden katalytischen Domänen aus (WALKER et al 1994, WILSON et al. 1994, ROTONDA et al. 1996). Die proteolytische Spaltung durch Caspasen erfolgt lediglich hinter Aspartatsäuren, wobei die letzten vier Aminosäuren die effektive Katalyse unterstützen (COHEN et al. 1997). Die Aktivierung der Initiatorcaspasen erfolgt im Rahmen der rezeptorvermittelten Signaltransduktion nach Rekrutierung an den Todeskomplex (DISC) durch Assoziation ihrer in der Prodomäne gelegenen *Death effector domain* (DED) an die entsprechende DED der Adaptermoleküle (FADD). Bei der mitochondrial induzierten Signaltransduktion kommt es durch Bindung an die *Caspase recruitment domain* (CARD) zur Aktivierung der Caspasen (BOLDIN et al. 1996). Dies zieht eine Kaskade von Caspase-Aktivierungen nach sich, an deren Ende die proteolytische Spaltung zellulärer Substrate (**Tab.1.1**) durch die Effektorcaspasen und konsekutiv die typischen morphologischen Zeichen der Apoptose stehen (THORNBERRY et al. 1998).

Klasse	Folge der Proteolyse	Substrat	Funktion
I	Aktivierung	Caspasen PKC δ (protein kinase C) PAK2 (p21 activated kinase 2)	Proteolyse
II	Inaktivierung	DNA-PKcs (DNA-Proteinkinase) Rb D4-GDI (GDP-Dissoziationsinhibitor D4)	
III	Zellumstrukturierung	Aktin Gas2 Gelsolin Lamine Typ A + B	
IV	Unbekannt	Fodrin Hnrp C1 + C2 Mdm2 PARP SnRNP U1-70K	

Tabelle 1.1 : Substrate der Effektorcaspasen und ihre funktionelle Bedeutung

I.4 NF-kappa B: Gegenspieler der apoptotische Potentiale

Im Jahr 1986 entdeckten SEN und BALTIMORE einen nukleären Transkriptionsfaktor, der an einem 10-Basenpaar langen Motiv innerhalb der intronischen *Enhancer*-Region der κ -Leichtketten der Immunglobuline nach Stimulation eukaryotischer B-Zellen mit bakteriellen Lipopolysachariden band. Es konnte eine Gruppe von Proteinen identifiziert werden, die ebenfalls diese DNA-Bindungsaktivität aufwiesen. Somit entstand die Familie der NF- κ B/Rel-Familie (SEN und BALTIMORE 1986). Diese Gruppe umfaßt die in Säugetieren existierenden Proteine NF- κ B1 und NF- κ B2 sowie die Rel-Proteine RelA, RelB und c-Rel. Ihre Gemeinsamkeit ist unter anderem eine hohe Sequenzhomologie innerhalb ihrer N-terminalen 300 Aminosäuren. Sie weisen neben dem nukleären Lokalisationssignal auch das DNA-Bindemotiv und eine Dimerisations-Domäne auf (NOLAN et al. 1991). Homo- und Heterotrimere, die aus den einzelnen Mitgliedern geformt werden, binden an dem erwähnten DNA-Bindemotiv GGGRNNTYCC (R = G oder A; Y = C oder T; N = beliebiges Nukleotid).

Die Rel-Proteine besitzen zusätzlich eine C-terminale Transaktivierungs-(TA) Domäne. Im Gegensatz dazu werden NF- κ B1 und 2 als Vorläuferprotein von 105 und 100 kDa synthetisiert und proteolytisch in die funktionellen Proteine NF- κ B1p50 und NF- κ B2p52 gespalten. Diese Vorläuferproteine enthalten Ankyrin-Gruppen im C-terminalen Bereich, die als I κ B- γ bezeichnet werden und dafür sorgen, daß die p50- und p52-Einheiten in inaktiver cytoplasmatischer Form vorliegen (MAY et al. 1998). Weitere Ankyrin-Gruppen tragende I κ Bs (I κ B- α , I κ B- β , I κ B- ϵ und Bcl-3) komplexieren in unstimulierten Zellen NF- κ B/Rel-Proteine und maskieren dadurch das nukleäre Lokalisationssignal. Erst nach Phosphorylierung und anschließender proteolytischer Spaltung werden die Transkriptionsfaktoren aus ihrer inaktiven cytoplasmatischen Lokalisation entlassen (BAUERLE et al. 1988).

Eine Aktivierung der NF- κ B/Rel-Familie erfolgt durch Zytokine, bakterielle und virale Produkte, mitogene Signale von Antigenrezeptoren der T- und B-Zellreihe und durch oxidativen Streß (BAEUEERLE et al. 1996, VERMA et al. 1995, BALDWIN et al. 1996, GHOSH et al. 1998) (**Tab. 1.2**).

Zytokine	IL-1, IL-2, IL-18, IFN- γ , TNF α , TRAIL
Bakterien, Viren und ihre Produkte	HIV, HSV, HTLV-1, HBV, EBV, LPS, Shigella flexneri, Mycobacterium tuberculosis
Mitogene	Phorbol ester, Lectine, anti-CD28, -CD40
oxidativer Streß	UV-, X-, γ -Strahlung, Schwermetalle

Tabelle 1.2: NF- κ B-aktivierende Stimuli

Kommt es nach einer Liganden-induzierten Trimerisation der TNF-Rezeptoren zur konsekutiven Rekrutierung von TRAF2, wird die Kinase NIK (*NF- κ B inducing kinase*) aktiviert. Diese Kinase-Aktivierung wiederum führt zur Induktion der I κ B-Kinasen (IKK1/IKK α und IKK2/IKK β), die Bestandteil eines 700-900 kDa großen Komplexes, dem Signalosom, sind. Ihrerseits wird durch Phosphorylierung von Serinen im N-terminalen Bereich der Faktoren I κ B α und I κ B β die Translokation von NF- κ B in weniger als 15 Minuten in den Zellkern eingeleitet (DIDONATO et al. 1997, REGNIER et al. 1997, MERCURIO et al. 1997, WORONICZ et al. 1997) (**Abb. 1.4**).

Im Zellkern erfolgt schließlich die Transkriptionsregulation zahlreicher Gene, deren Proteine unter anderem durch ihr antiapoptotisches Potential an der Regulation des programmierten Zeltodes beteiligt sind (**Tab. 1.3**). Einige dieser Apoptoseinhibitoren werden aufgrund struktureller und funktioneller Gemeinsamkeiten zur Familie der Inhibitor of apoptosis protein (IAP) zusammengefaßt (CHU et al. 1997, STEHLIK et al. 1998).

Zytokine	IL-1, IL-6, IL-8
Rezeptoren	IL-2R, DcR1, Ig- κ -Leichtkette
Adhäsionsmoleküle	ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1
Chemokine	MCP-1, MIP-1
Transkriptionsfaktor-assoziierte Proteine	I κ B α , c-Myc, p53
Enzyme	Cyclooxygenase-2, 5-Lipoxygenase, NO-Synthetase
Apoptoseinhibitoren	cIAP-1, cIAP-2, XIAP

Tabelle 1.3: NF- κ B-induzierte Gene

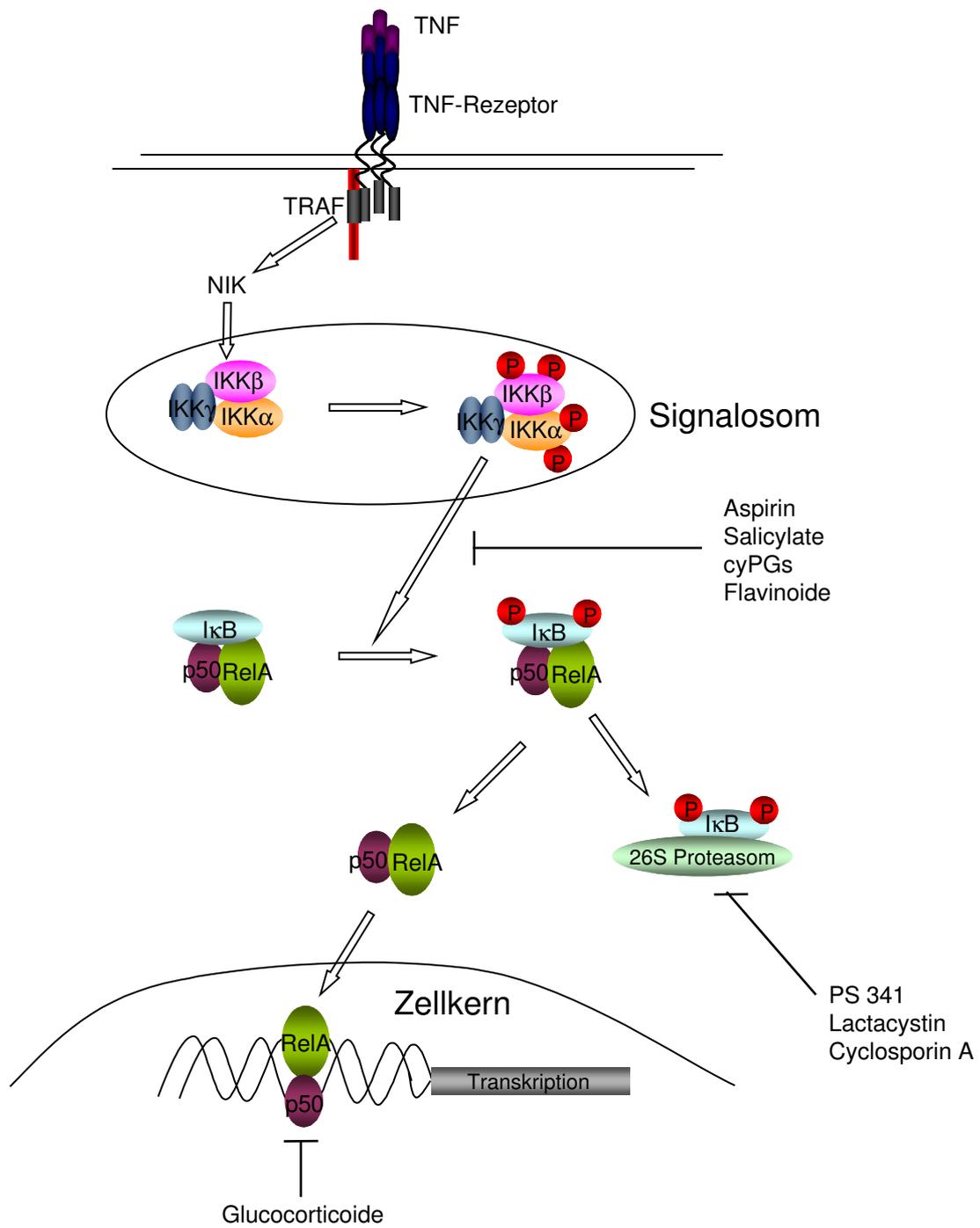


Abb. 1.4: Signalweg der NF- κ B-Translokation in eukaryotischen Zellen.

I.5 Apoptoseinhibitoren: Die IAP-Familie und ihre Rolle in humanen Karzinomen

I.5.1 Die IAP-Familie: struktureller Aufbau und Mechanismen der Apoptoseinhibition

Neoplastische Läsionen entstehen durch die Transformation einer normalen Zelle in eine genetisch instabile Tumorzelle. Diese ist im Laufe der Karzinogenese zum einen durch ein unkontrolliertes Proliferationspotential und den Verlust an Zelladhäsionsmolekülen gekennzeichnet, zum anderen besitzt sie aber auch die Fähigkeit, den Mechanismen der Apoptose, die durch die Attacke des aktivierten Immunsystems oder die cytotoxischen Effekte einer herkömmlichen Radio- oder Chemotherapie getriggert wird, zu entkommen (HANNUN et al. 1998). Die Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod erreichen transformierte Tumorzellen zum Beispiel durch die Überexpression antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2 (COUSTAN-SMITH et al. 1996) oder eine gesteigerte Expression von FLIP, das eine zunehmende Resistenz gegenüber dem CD95-vermitteltem Zelltod bedingt (IRMLER et al. 1997). Zunehmende Aufmerksamkeit hat in diesem Zusammenhang auch eine Gruppe apoptoseinhibierender Proteine mit funktioneller und struktureller Verwandtschaft, die IAP-Familie, erlangt.

Bei der Inhibitor of apoptosis protein (IAP)-Familie handelt es sich um eine in zahlreichen Geweben exprimierte Gruppe von Genen mit hoher struktureller Homologie und antiapoptotischer Funktion. Das erste Mitglied dieser Familie wurde von CROOK et al. (1993) und BIRNBAUM et al. (1994) in den Baculoviren vom *Typ Cydia pomonella* Granulose-Virus (CpGV) und *Orgyia pseudotsugata* Polyhedrose-Virus (OpMNPV) entdeckt. Im Laufe der letzten Jahre wurden Mitglieder dieser Familie in zahlreichen Eukaryoten wie Hefen, Nematoden, *Drosophila melanogaster* und einigen Säugetieren (LACASSE et al. 1998, WENZEL et al. 2000) entdeckt.

Ein gemeinsames, strukturelles Merkmal der IAPs stellt das Vorhandensein eines oder mehrerer, aus 70 Aminosäuren bestehenden Motive, der BIR (baculovirus IAP repeats) - Domäne dar. Die BIR-Domänen der IAPs interagieren mit Caspasen und inhibieren in Säugetieren Caspase-3 und -7, sowie die inaktive Procaspase-9, wodurch sie ihre antiapoptotische Funktion erhalten (DEVERAUX et al., 1997 ROY et al., 1997, TAKAHASHI et al. 1998 TAMM et al. 1998). Neben der BIR-Domäne enthalten einige IAPs weitere Motive, wie

den RING (*really interesting new gene*)-Finger (FREEMONT et al., 1991), die UBC-Domäne (HAUSER et al., 1998) oder die Caspase-rekrutierenden CARDs (HOFMANN et al., 1997).

Neben der Caspase-inhibierenden Funktion besitzen insbesondere die IAPs des humanen Systems (IAP1, IAP2 und XIAP) weitere Caspase-unabhängige anti-apoptotische Mechanismen wie die Potenzierung ihrer Expression durch Aktivierung von NF- κ B durch IAP1 und XIAP (ROTHER et al. 1995;) sowie der Aktivierung von JNK 1 durch IAP2 und XIAP (SANNA et al, 1998). So konnte auch für die humanen IAPs 1 und 2 eine Interaktion mit TRAF 2 nachgewiesen werden, wobei noch gezeigt werden muß, ob dadurch eine zytoprotektive Wirkung ausgelöst wird (ROTHER et al., 1995). Schließlich konnten MCCARTHY et al. (1998) eine durch die Interaktion zwischen HIAP1 und der pro-apoptotischen Kinase RIP2 vermittelte Apoptoseinhibition in der Brustkarzinomzelllinie MCF7 nachweisen. IAPs schützen gegenüber dem programmierten Zelltod, der durch TNF α (STEHLIK et al. 1998, WANG et al. 1998), Fas/CD95 (HAWKINS et al., SUZUKI et al. 1998), Chemotherapeutika (z.B. Etoposid, Cisplatin, Taxol) (WANG et al., ROY et al. 1997, LI et al. 1998, DUCKETT et al. 1996), ionisierende oder UV-Strahlung (HAY et al. 1995, DUCKETT et al. 1996, MANJI et al. 1997), oxidativen Stress (LISTON et al. 1996), virale Infektionen (HARVEY et al. 1996) und zahlreiche andere Stimuli ausgelöst wird (LACASSE et al. 1998). Auf eine Beteiligung der Mitglieder der IAP-Familie im Rahmen der Tumorenstehung deutet zum einen die durch sie vermittelte Apoptoseresistenz, die zur Tumorprogression und Therapieresistenz beitragen könnte, und zum anderen die spezifische Re-Expression von Survivin in humanen Tumoren hin.

1.5.2 Survivin: ein Apoptoseinhibitor mit zellzyklusregulierendem Einfluß

Survivin wurde 1997 von AMBROSINI et al. im Rahmen eines Hybridisierungsscreenings einer humanen genomischen P1-Datenbank mit der cDNA des Effektor-Zell-Protease-Rezeptors-1 (*EPR-1*) identifiziert. Das ca. 15 kb umfassende Survivin-Gen ist auf Chromosom 17q25 lokalisiert und umfaßt vier Exons. Der Survivin-Promotor enthält die für in der G2/M-Phase exprimierten Gene typischen drei Zellzyklus-abhängigen Elemente *cell cycle dependent elements (CDE)* sowie eine Zellzyklus-Homologieregion *cell cycle homology region (CHR)*; LI et al. 1998). So konnten Promoteranalysen durch LI et al. (1999) eine zellzyklusabhängige Expression der Survivin-mRNA detektieren, die in der G1-Phase schwach und in der S-Phase sowie der G2/M-Phase um ein mehrfaches gesteigert ist. MAHOTKA et al. (1999) konnten neben der klassischen Survivinvariante zwei durch posttranskriptionales alternatives Spleißen

generierte Isoformen, Survivin- Δ Ex3 und Survivin-2B, in Nierenkarzinom-Zelllinien nachweisen. Das Survivin-Gen kodiert demnach für ein aus 142 Aminosäuren bestehendes Protein mit einer Molekularmasse von ca. 16 kDa, der klassischen Survivin-Variante, ein 165 Aminosäuren langes als Survivin-2B bezeichnetes Protein und eine 137 Aminosäuren umfassende Survivin- Δ Ex3-Isoform. Interessanterweise verfügt Survivin lediglich über eine einzige BIR-Domäne, die für die antiapoptotische Funktion dieser Proteinfamilie verantwortlich gemacht wird. Im Survivin- Δ Ex3-Protein führt der Prozeß des alternativen Spleißens über einen Verlust von Exon 3 und einen verschobenen Leseraster zu einer Verkürzung der BIR-Domäne um 14 Aminosäuren. Hingegen führt die Insertion von Exon 2B im Survivin-2B-Protein zu einer Unterbrechung der BIR-Domäne. Ferner weisen alle drei Survivin-Isoformen weder einen C-terminale RING-Finger noch eine CARD-Domäne auf. Wie Transfektionsversuche zeigten, inhibiert Survivin den programmierten Zelltod signifikant in der IL-3-abhängigen BaF3-prä-B-Zelllinie nach IL-3-Entzug (AMBROSINI et al. 1997) und in der Taxol-behandelten Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3 (LI et al. 1998). So zeigten auch MAHOTKA et al. (1999), daß eine transiente Überexpression von Survivin- oder Survivin- Δ Ex3 in HepG2-Hepatomazellen nach Behandlung mit Methotrexat oder dem agonistischen anti-Fas-Antikörper den apoptotischen Zelltod signifikant inhibierte. Demgegenüber überlebten in den Survivin-2B-Transfektanten deutlich weniger Zellen, was auf einen Verlust der antiapoptotischen Wirkung dieser Survivin-Isoform hinweist. *In vitro* Studien konnten zeigen, daß Survivin seine antiapoptotische Wirkung durch Bindung der aktiven Untereinheiten der Caspasen-3 und -7 entfaltet (TAMM et al. 1998, SHI et al. 2000). Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation ergaben, daß Survivin ein mitotisches Protein ist, das in der Pro- bis Anaphase an die Mikrotubuli der Mitosespindel bindet und bis zur späten Telophase in den „midbodies“ verbleibt. Die Interaktion zwischen Survivin und den Mikrotubuli erfolgt über eine sogenannte coiled-coil-Sekundärstruktur am C-terminalen Ende (LI et al. 1998). So führt die Überexpression einer dominant-negativen Mutante ohne coiled-coil-Motiv oder gar die Expression einer Survivin-antisense-cDNA neben einer erhöhten spontanen Apoptoserate zu Zellteilungsdefekten in Form von überzähligen Zentromeren, aberranten Mitosespindeln und Polyploidie (LI et al. 1998). Ähnliche Hinweise auf die zytokinetische Bedeutung ergaben auch die Ergebnisse von FRASER et al. (1999) und SPELIOTES et al. (2000) für das Survivin-Homolog bir1 im Nematoden *C. elegans*: Der Verlust von bir1 in Embryonen führt zur ausbleibenden Ausrichtung der Chromosomen für die Zellteilung, Abnormalitäten der Mittelzone des Spindelapparates und Akkumulation vielkerniger Zellen. Dieser Effekt konnte durch Überexpression von Survivin hingegen teilweise kompensiert werden. Durch seine

Beteiligung am G2/M-Kontrollpunkt (GUO et al. 1999) und der Apoptosekontrolle während der Mitose durch Suppression der Caspase-3- und -9 Aktivität, die essentielle Bestandteile des Spindelapparates spalten, kann man Survivin als Bindeglied zwischen Apoptose und Zellzyklus verstehen. (ANDRADE et al. 1999, ALTIERI et al. 1998, REED et al. 1999).

Expressionsanalysen auf RNA-Ebene und Proteinebene zeigten eine hohe Survivinexpression in fötalen Geweben und zahlreichen Tumoren *in vitro* als auch *in vivo*. Interessanterweise wurde dagegen Survivin, im Gegensatz zum breiten Expressionsmuster anderer Mitglieder der IAP-Familie, nicht in normalem, adultem, humanem Gewebe, mit Ausnahme von Thymus und Plazenta, detektiert. Survivin- Δ Ex3 und -2B wurden zunächst lediglich in Nierenzellkarzinomen *in vitro* auf RNA-Ebene nachgewiesen werden (MAHOTKA et al. 1999). Die prognostische Bedeutung einer Survivinexpression für Tumorerkrankungen lieferten erste Expressionsstudien in Biopsaten von Patienten mit unterschiedlichen Tumoren. So konnte gezeigt werden, daß die Survivin-Überexpression signifikant mit einer niedrigeren Überlebensrate korreliert (**Tab.1.4**).

Tumorentität	Literatur
Basalzellkarzinom	Grossman et al. (1999)
Colonkarzinom	Kawasaki et al. (1998), Sarela et al. (2000)
Harnblasenkarzinom	Swana et al. (1999)
Mammakarzinom	Tanaka et al. (2000)
Neuroblastom	Adida et al. (1998), Islam et al. (2000)
nichtkleinzelliges Lungenkarzinom	Monzo et al. (1999)
Ösophaguskarzinom	Kato et al. (2001)
Plattenepithelkarzinom der Haut	Grossman et al. (1999)

Tabelle 1.4: Survivinexpression in verschiedenen humanen Tumorentitäten

Ferner konnten KATO et al. (2001) erstmals eine Korrelation zwischen dem Expressionsstatus von Survivin und der Ansprechbarkeit auf eine präoperative Chemotherapie zeigen. So fand sich in Biopsaten von Patienten, die eine partielle Remission nach präoperativer Chemotherapie mit einem Zyklus Cisplatin und 5-FU aufwiesen, eine signifikant schwächere Expression von Survivin als bei partieller oder fehlender Remission.

1.6 Aufgabenstellung und Zielsetzungen

Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst eine molekularbiologische Analyse zum Expressionsstatus von TRAIL-Ligand und TRAIL-Rezeptoren in unterschiedlichen Nierenkarzinomzelllinien. Dieser Fragestellung wurde durch die erstmalige Identifikation und Charakterisierung von bislang nicht bekannten Spleißvarianten der TRAIL-Rezeptoren und – Liganden eine neue Richtung gegeben.

In einem zweiten Teilprojekt wurde der Frage nachgegangen, inwieweit unterschiedliche Mitglieder der IAP-Familie an der synergistischen Wirkungsverstärkung von TRAIL und Topotecan auf Nierenzellkarzinome beteiligt sind.

In einem dritten Teilprojekt wurde das Expressionsverhalten von verschiedenen, von unserer Arbeitsgruppe neu identifizierter Survivin-Spleißvarianten während der Progression von Nieren- und Magenkarzinomen untersucht.

II. MATERIAL UND METHODEN

II.1 Material

II.1.1 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
β-Szintillationscounter	Beckmann
Gelelektrophoreskammer	Pharmacia, GNA 100 und GNA 200
DM IRB Inversionsmikroskop	Leica
Sequi-Gen II Sequencing Cell	BIO-RAD
Sequi-Gen II Precision Caster Adaptor Kit	BIO-RAD
Ultra Turrax Homogenisator	IKA Analysentechnik GmbH
Mighty Small Transfer Electrophoresis Unit	Hoefer
Mighty Small SE 245 Dual Gel Caster	Hoefer
pH-Meter	Beckmann, Typ 340
Sequi-Gen II Sequencing Cell	BIO-RAD
Sequi-Gen II Precision Caster Adaptor Kit	BIO-RAD
Sequenziergerät	Genetic Analyzer 310 Applied Bio System
Spektralphotometer DU 640	Beckmann
Sterilbank NSF 49	Clean Air Deutschland
TCS-NT Confocal Laser Scanning System	Leica
PTC-100 Thermocycler	Biozym Diagnostic, Hess, Oldendorf, Germany
Thermomixer Typ 5436	Eppendorf
Transilluminator TFX-20M	Vilber Lourmat
UV-Crosslinker XL-1000	Spectronics Corporation
Zählkammer	Neubauer
Zentrifugen	Heraeus (Osterode), Megafuge 1.0R Hettich, Univeral 16R

II.1.2 Plastikwaren und Einwegartikel

Plastikwaren und Einwegartikel wurden von den Firmen Falcon (Becton-Dickinson), Eppendorf und Nunc bezogen.

II.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agar	Sigma Aldrich
Agarose	Peqlab
Ammoniumpersulfat	Gibco BRL
Bromphenolblau	Merck
Borsäure	Merck
β -Mercaptoethanol	Merck
Bacto-Trypton (Pepton)	Sigma Aldrich
BSA	Sigma Aldrich
CAPE	Calbiochem
Chloroform	Merck
Desoxynkleosidtriphosphate (dNTPs)	
25 mM each	Stratagene
10 mM each	Qiagen
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP SCP 205 (10 MBq/25 } \mu\text{l)}$	Hartmann Analytic
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dUTP SCP 210 (10 MBq/25 } \mu\text{l)}$	Hartmann Analytic
Diethylpyrocarbonat	Sigma
DMSO	Sigma Aldrich
EDTA	Roth
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Roth
Formaldehyd 37 %	Merck
Formamid	Merck
L-Glutamin	Gibco BRL
Guanidiniumthiocyanat	Sigma
Hefeextrakt	Serva
HEPES	Gibco BRL
Interferon- γ	Sigma Aldrich
IPTG	Roth

Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Roth
Methylenblau	Sigma Aldrich
Milchpulver	BioRad
MOPS	Roth
Nitrozellulosemembran Hybond N	Amersham Life Science
Nitrozellulosemembran Optitran	Schleicher & Schuell
Natriumchlorid	Roth
Natriumacetat	Merck
Natriumcitrat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
PBS	Sigma Aldrich
N-Lauroylsarcosin	Sigma Aldrich
Phenol, wassergesättigt	Appligene-Oncor
Chloroform	Merck
Polyacrylamidgel	Biozym, Sequagel 6
Polyvinylpyrrolidone	Sigma Aldrich
Ponceau-Rot	Sigma Aldrich
random-Primer	Stratagene
SDS	Roth
Sephadex G50	Pharmacia Biotech
Silan A	Merck
Topotecan (Hycamtin)	Smith Kline Beecham
rh-TRAIL	TEBU
Trypanblau	Biochrom KG
Tween 20	Merck
Wasser, HPLC-Qualität	Roth
X-Gal	Roth

II.1.4 Enzyme

Enzym	Hersteller
Alkalische Phosphatase	Gibco BRL
AMV Reverse Transkriptase	Promega
<i>Bam</i> H I	Gibco BRL
<i>Eco</i> R I	Gibco BRL
Taq DNA-Polymerase	Sigma, Qiagen
<i>Not</i> I	New England Biolabs
<i>Sac</i>	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	Gibco BRL

II.1.5 Molekularbiologische Kits

Bezeichnung	Hersteller
RNeasy Total RNA Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Plasmid Mini, Midi und Maxi Kit	Qiagen
<i>rediprime</i> DNA Labeling System	Amersham Life Technologies
Big Dye Primer Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems GmbH
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche
pGEM-T-Vector System I	Promega
RiboQuant Multi-Probe RNase protection assay system (# 559398)	Pharmingen

II.1.6 Puffer und Lösungen

<u>100 X Denhardts Reagenz</u>	10 g Ficoll 400
	10 g Polyvinylpyrrolidon
	10 g BSA Fraktion V
	Aqua dest ad 500 ml

<u>Gelladepuffer für Agarosegele</u>	50 % Glycerin (v/v) 0,25 % Bromphenolbau (w/v) 0,25 % Xyancyanol (w/v)
<u>Formaldehyd-Ladepuffer</u>	50 % Glycerin (v/v) 1 mM EDTA, pH 8.0 0,25 % Xylencyanol (w/v) 0,25 % Bromphenolblau (w/v)
<u>GITC-Lysepuffer (Solution D)</u>	4 M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat, 0,5% N-Lauroylsarcosin, 0,1 M β -Mercaptoethanol
<u>10 X MOPS, pH 7,0</u>	200 mM MOPS 0,8 mM Natriumacetat 10 mM EDTA
<u>5 X TBE</u>	450 mM Tris-Borat 10 mM EDTA
<u>TE-Puffer</u>	10 mM Tris-HCl, pH 7,4 0,1 mM EDTA, pH 8,0
<u>20 X SSC, pH 7,0</u>	0,3 M Natriumcitrat, 3 M Natriumchlorid
<u>Northern Blot –Hybridisierungslösung</u>	50% Formamid, 5x SSC, 1% SDS, 2x Denhardts Solution, 0,5 M Natriumhydrogenphosphat pH 7,

<u>Northern-Blot-Waschpuffer</u>	1X SSC 1% SDS
<u>Ponceaurot-Färbelösung</u>	0,2% Ponceaurot-Lösung in 5% Essigsäure
<u>Protein-Lysepuffer</u>	0,1 M Natriumchlorid 10 mM Tris-HCl (pH 7,6) 1 mM EDTA (pH 8) 1 % (v/v) Nonidet P40
<u>Western-Blot-Blockadereagenz</u>	1 % BSA 3 % (w/v) Milchpulver in PBS
<u>Western-Blot-Transferpuffer, pH 8,3</u>	25 mM Tris-Cl 192 mM Glycin 20 % Methanol
<u>Western-Blot-Waschpuffer</u>	100 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 0,2 % Tween

II.1.7 Oligonukleotide (Primer)

II.1.7.1 Oligonukleotide für RT-PCR

Primer- Bezeichnung	Accession No.	Richtung	Sequenz (5' → 3')	Position
GAPDH	J04038	sense	ACG GAT TTG GTC GTA TTG GGC G	59-80
		antisense	CTC CTG GAA GAT GGT GAT GG	251-270
DcR 1	AF012536	sense	CTG CCA GTC CTA GCT TAC TCT G	247-268
		antisense	CTG CTA CAC TTC CGG CAC ATC T	560-581
DcR 2	AF029761	sense	GAC CCC AAG ATC CTT AAG TTC G	40-61
		antisense	TGT TCT ACA CGT CCG GCA CAT C	399-420
DR4	U90875	sense	CAG AAC GTC CTG GAG CCT GTA AC	416-438
		antisense	ATG TCC ATT GCC TGA TTC TTT GTG	691-714
DR5	AF018658	sense	GAT TGT ACA CCC TGG AGT GAC ATC G	505-529
		antisense	CCA CAG TAA AGA CTT GCA AAC AAA CAC	685-711
Survivin	U75285	RT	AGG AAC CTG CAG CTC AGA	914-931
		sense	GCA TGG GTG CCC CGA CGT TG	48-67
		antisense	GCT CCG GCC AGA GGC CTC AA	475-494
E-TRAILs	U37158	sense	<u>GAA TCC</u> CAT GGC TAT GAT GGA GGT CCA G	87-109
B-TRAILs		antisense	<u>GGA TTC</u> GAG GAC CTC TTT CTC TCA CTA	425-445

II.1.7.2 Oligonukleotide für die Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
SP6	GAT TTA GGT GAC ACT ATA G
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

II.1.8 Vektoren

Vektor	Größe (kb)	Resistenzgen	Hersteller
pEGFP-C1	4,7	Kann	Clontech
pGEM-T	3,003	Amp	Promega

II.1.9 Plasmidkonstrukte

Bezeichnung	Vektor	Insert	Restriktionsstellen	Herstellung
hTRAIL- Δ Ex3-EGFP	pEGFP-C1	TRAIL- Δ Ex3-cDNA	<i>EcoRI/BamHI</i>	Produkt aus RT-PCR mit Primern E-TRAIL und B-TRAIL amplifiziert
hTRAIL- Δ Ex2/3-EGFP	pEGFP-C1	TRAIL- Δ Ex2/3-cDNA	<i>EcoRI/BamHI</i>	Produkt aus RT-PCR mit Primern E-TRAIL und B-TRAIL amplifiziert
hTRAIL-EGFP	pEGFP	TRAIL-cDNA	B. Fang, Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, University Texas	

II.1.10 Antikörper

II.1.10.1 Primäre Antikörper

Antigen	Charakteristika	Immunogenität	Spezies	Hersteller
Survivin	pAk, IgG	rhSurvivin	Kaninchen	R&D Systems
TRAIL (Apo2L)	mAk, IgG _{2b}	AS 32-115	Maus	Pharmingen
XIAP	pAk, IgG	AS 244-263	Kaninchen	R&D Systems

II.1.10.2 Sekundäre Antikörper

Merkmal	Spezies	Hersteller
Anti-Kaninchen IgG, Peroxidase- (HRP) gekoppelt	Esel	Amersham Life Technologies
Anti-Maus IgG, Peroxidase-(HRP) gekoppelt	Schaf	Amersham Life Technologies

II.1.11 Medien und Zusätze für BakterienSOB-Medium, pH 7,0

2% (w/v) Bacto-Trypton (Pepton),
0,5% (w/v) Hefeextrakt,
0,05% NaCl,
25 mM KCl,
10 mM MgCl₂

LB-Medium, pH 7,0

1% (w/v) Bacto-Trypton (Pepton),
0,5% (w/v) Hefeextrakt,
1% (w/v) NaCl

II.1.12 Zellkulturmedien, -lösungen und Zusätze

Die Zellkulturmedien und -zusätze wurden von den Firmen Gibco BRL, Sigma Aldrich und Seromed Biochrom KG bezogen.

DMEM versetzt mit:

- 10 % (v/v) fötales Kälberserum (FCS)
- 2 mM Glutamin
- 200 mg/l Arginin (nur für RCCs)
- 72 mg/ml Asparagin (nur für RCCs)
- 10 mM HEPES
- 100 U/ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin

Trypsin/EDTA-Lösung

- 0,25 % (w/v) Trypsin
- 0,05 % (w/v) EDTA
- ad PBS

Trypanblau

- 0,2 % (w/v) Trypanblau
- ad PBS

II.1.13 Zelllinien

Die in der Arbeit verwendeten 32 permanenten Nierenzellkarzinomlinien wurden aus Tumoren der 3 häufigsten histologischen Typen etabliert (GERHARZ et al. 1993, GERHARZ et al. 1994, GERHARZ et al. 1995, GERHARZ et al. 1996). Einige der untersuchten Zelllinien wurden bezüglich ihres VHL-Mutationsstatus (HERNANDEZ et al. 1999) und des p53-Mutationsstatus charakterisiert.

Zelllinie	Staging des Ausgangstumors	Grading des Ausgangstumors	p53-Status	VHL- Status	Geschlecht	Alter des Patienten
clearCa-1	pT3a	G2	Codon 213, CGA→CGG Codon 276, GCC→GAC	n.u.	männlich	67
clearCa-2	pT3a	G3	Codon 306, CGA→CAA	frame shift	männlich	51
clearCa-3	pT3a	G2	Wildtyp	n.u.	weiblich	66
clearCa-4	pT2	G1	Codon 273, CGT→CAT	Wildtyp	weiblich	75
clearCa-5	pT3b	G3	Mikrodeletionen der Nukleotide	n.u.	weiblich	69
clearCa-6	pT3b	G3	Codon 290, CGC→CAC	frame shift	männlich	59
clearCa-7	pT2	G3	Wildtyp	n.u.	männlich	53
clearCa-8	pT3b	G2	Wildtyp	Wildtyp	männlich	67
clearCa-9	pT2	G1	Codon 176, TGC→TTC	Wildtyp	weiblich	59
clearCa-10	pT3b	G2	Wildtyp	n.u.	weiblich	44
clearCa-11	pT2	G2	Wildtyp	Wildtyp	weiblich	59
clearCa-12	pT3a	G2	Wildtyp	n.u.	männlich	60
clearCa-13	pT2	G2	Wildtyp	n.u.	weiblich	73
clearCa-14	pT3b	G3	Wildtyp	n.u.	männlich	55
clearCa-15	pT3a	G3	Wildtyp	n.u.	männlich	60
clearCa-16	pT3a	G2	Wildtyp	n.u.	weiblich	57
clearCa-17	pT3a	G3	Codon 213, CGA→CTA	n.u.	männlich	62
clearCa-18	pT2	G2	Codon 199, GGA→GTA	n.u.	männlich	66
clearCa-19	pT2	G2	Wildtyp	n.u.	männlich	39
clearCa-20	pT3a	G3	Wildtyp	n.u.	männlich	65
clearCa-21	pT3a	G2	Wildtyp	n.u.	männlich	72
clearCa-22	pT2	G2	Wildtyp	n.u.	männlich	49
clearCa-23	pT2	G1/2	Wildtyp	frame shift	männlich	63
clearCa-24	pT3a	G2	Codon 251, ATC→ATG	n.u.	männlich	53
clearCa-25	pT2	G2	Wildtyp	n.u.	männlich	64
clearCa-26	pT2	G1	n.u.	n.u.	weiblich	68
clearCa-27	pT3a	G3	n.u.	n.u.	männlich	72
chromphi-1	pT3b	G3	Wildtyp	n.u.	männlich	64
chromphi-2	pT3a	G2	Wildtyp	n.u.	männlich	63
chromphi-3	pT3a	G2	Wildtyp	Wildtyp	männlich	64
chromphi-4	pT2	G1	Wildtyp	Wildtyp	männlich	71
chrompho-A	pT3a	G3	Codon 199 GGA→GTA	Wildtyp	weiblich	83

Tabelle 2.1 : verwendete Nierenkarzinom Zelllinien: n.u. = nicht untersucht

II.1.14 Gewebeproben

Aus Nephrektomiepräparaten von 69 Patienten mit Nierenzellkarzinom wurden Proben neoplastisch transformierten Gewebes entnommen und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C eingefroren.

II.1.15 Escherichia coli Stämme

Für Transformationsversuche wurde der E. coli-Stamm XL1-Blue eingesetzt.

II.1.16 Software und Server

Software

Lasergene DNASTAR; Version 4.03

PC/Gene Packages, Version 6.60

SPSS Software; Version 9

Server	Adresse
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
ClustalW	http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multialign/Options/clustalw.html
PSORT II	http://psort.nibb.ac.jp

II.2 Methoden

II.2.1 Kultivierung von adhärennten Zellen

Alle verwendeten Nierenzellkarzinomlinien wurden in *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Bei Erreichen eines konfluenten Zellrasens wurden zur Passage die adhärennten Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst.

II.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Lebendzellzahl wurde durch lichtmikroskopische mäanderförmige Auszählung der Zellen nach Färbung mit 0,02 % Trypanblau in einer NEUBAUER-Zählkammer bestimmt (RICK, klinische Chemie und Mikroskopie). Dazu wurden die abgelösten Zellen in einem definierten Volumen Medium resuspendiert. 100 µl dieser Suspension wurden mit 50 µl Trypanblau gemischt und in Doppelbestimmungen jeweils die 4 Eckquadrate von einem Zählnetz ausgezählt und die Lebendzellzahl errechnet:

Fläche	1 Eckquadrat:	1,0 mm ²
Höhe	1 Eckquadrat:	0,1 mm
Volumen	1 Eckquadrat:	0,1 µl
Volumen	4 Eckquadrate:	0,4 µl

n	=	Zellen in 0,4 µl 2 : 1 mit Trypanblau verdünnter Suspension
$n \times 1,0 / 0,4$	=	Zellen in 1 µl 2 : 1 mit Trypanblau verdünnter Suspension
$n \times 1,0 / 0,4 \times 0,5$	=	Zellen in 1 µl unverdünnter Suspension
$n \times 1,25$	=	Zellen / µl Suspension

II.2.3 Zytostatika- und Zytokin- Behandlung von adhärennten Zellen

Zur Untersuchung des programmierten Zelltodes und dessen Signalwege in Nierenkarzinomzelllinien wurden diese mit verschiedenen Substanzen behandelt (s. Tabelle). Es wurden $4-8 \times 10^4$ Zellen/well in 24 well Platten zur Bestimmung der Lebendzellzahl bzw. $1-3 \times 10^6$ Zellen/well zur RNA-Isolation ausgesät und über Nacht inkubiert. Die Substanzen wurden auf die Endkonzentrationen in Zellkulturmedium verdünnt und den mit PBS gespülten Zellen zugegeben. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen abgelöst und die Lebendzellzahl bestimmt oder die Zellen zur RNA-Isolierung verwendet.

Substanz	Lösungsmittel	Endkonzentration
hu TRAIL	PBS	1, 10, 50, 100 ng/ml
Topotecan (Hycamtin®)	PBS	1 µg/ml

Tabelle 2.2: Verwandte Substanzen und Konzentrationen für Stimulationsversuche

II.2.4 Isolierung, Kultivierung und Stimulierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes

Blutproben von gesunden Spendern wurden vom Institut für Transfusionsmedizin der Heinrich Heine Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt (Univ.-Prof. Dr. med. R.E. Scharf). In ein 50 ml Falcon-Röhrchen wurden 15 ml Ficoll gefüllt und mit 30 ml in PBS verdünntem Vollblut bedeckt. Anschließend wurden die Proben für 20 Minuten bei 1800 rpm und 20 °C zentrifugiert. Die als weißer Ring sichtbare Phase, der sogenannte „buffy coat“, wurde abpipettiert. Die darin enthaltenen mononukleären Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 20 ml RPMI resuspendiert.

Für die Stimulierung mit dem Lectin Concanavalin A wurden den Zellen in einer Dichte von 5×10^5 /ml Medium mit 10 µg Con A/ml zugegeben. Nach zwei bis dreitägiger Stimulation wurde lichtmikroskopisch das Vorhandensein von Blasten überprüft und bei einer Zelldichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml wurden schließlich die Zellen zur RNA bzw. Proteinpräparation isoliert.

II.2.5 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäure

II.2.5.1 Isolierung und Aufreinigung von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen

Die Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen wurde über GITC-Zellyse und selektive Bindung an Silica-Gel-Membranen mit Hilfe des RNeasy Midi Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert.

II.2.5.2 Isolierung und Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Gewebeproben

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebeproben erfolgte modifiziert nach der „single-step“ Methode (CHOMCZYNSKI & SACCHI 1986) durch Aufschluß der Zellen mit Guanidiniumthiocyanat-Lysepuffer und nachfolgender Phenol-Chloroform-Extraktion.

Jeweils 100-900 mg der Gewebeproben wurden in gefrorenem Zustand in mit 1 ml GITC-Lysepuffer/100 mg Gewebe gefüllte Polypropylenröhrchen aufgenommen und mit Hilfe des Homogenisators für eine Dauer von einer Minute homogenisiert. Anschließend wurde dem Lysat jeweils 1 Volumen wassergesättigtes Phenol, 1/5 Volumen Chloroform und 1/10 Volumen 4 M Natriumacetat zugegeben und der Ansatz durch Schütteln vollständig gemischt. Es folgte nach einer 15-minütigen Inkubation eine Zentrifugation bei 4000 rpm für 30 Minuten. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Falcon-Röhrchen überführt, 1 Volumen Phenol-Chloroform zugegeben, 15 Minuten inkubiert und erneut für 30 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zur Elimination von Proteinen zweimal durchgeführt. Danach wurde der Überstand in ein neues Falcon-Röhrchen überführt, 1 Volumen Chloroform zugegeben und nach 15 minütiger Inkubation und Zentrifugation verbliebene Phenolreste entfernt. Die RNA im Überstand wurde mit 1 Volumen Isopropanol für 12 Stunden bei -24°C gefällt, abzentrifugiert und das RNA-Präzipitat zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in 100-400 μl DEPC- H_2O resuspendiert. RNA aus Magenkarzinomen von 35 Patienten wurde freundlicherweise von Frau Dr. H. Grabsch und Herrn Priv. Doz. Dr. W. Müller (Institut für Pathologie, HHU Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

II.2.5.3 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmid-DNA aus transformierten *E.coli*, die zur Sequenzierung, Herstellung genspezifischer Sonden für die RNA-Hybridisierung und Transfektion eingesetzt werden sollte, wurde nach der Anionenaustausch-Methode der Firma QIAGEN mit Hilfe des Plasmid Mini, Midi und Maxi Kits isoliert. Für jede Plasmidpräparation mit dem Plasmid Mini Kit wurden 3 ml Kulturvolumen eingesetzt, bei Kulturen in 250-500 ml Nährmedium wurden Midi- und Maxi-Kits verwendet. Die Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben.

II.2.5.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Im Agarosegel aufgetrennte DNA-Fragmente, die zur DNA-Ligation eingesetzt werden sollten, wurden unter einem UV-Transluminator ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) isoliert.

II.2.6 Modifizierung von Nukleinsäuren

II.2.6.1 DNA-Ligation

Für Ligationen mit kohäsiven Enden wurden 100 µg linearisierter, dephosphorylierter Vektor in dreifachem molarem Überschuß an Insert mit 0,1 U T4-Ligase für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

II.2.6.2 DNA-Restriktion

Die Restriktion von DNA wurde nach Herstellerangaben mit entsprechenden Restriktionendonucleasen durchgeführt. In einem 20 µl Restriktionsansatz wurden 2µg DNA mit 5 U Endonuklease im enzymespezifischen 1 X Restriktionspuffer für 1-2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

II.2.6.3 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden

Die Dephosphorylierung der linearisierten Vektoren erfolgte mit hitzeinaktivierbarer alkalischer Phosphatase bei 37 °C für 1 Stunde entsprechend der Herstellerangaben.

II.2.7 Präzipitation von Nukleinsäuren

Die Präzipitation von Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5fachem Volumen Ethanol sowie anschließender 1-stündiger Inkubation bei -70°C . Die Nukleinsäuren wurden anschließend durch 20-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C sedimentiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und im gewünschten Volumen H_2O aufgenommen

II.2.8 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte spektralphotometrisch nach SAMBROOK et al. (1989) und wurde nach folgenden Formeln errechnet:

$$C_{\text{RNA}} (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260\text{nm}} \times 40$$

$$C_{\text{dsDNA}} (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260\text{nm}} \times 50$$

II.2.9 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruchmethode (Didesoxymethode) (SANGER et al. 1977) in einer zyklischen Sequenzierungsreaktion durchgeführt. Die Markierungsreaktion zum Einbau der fluorchrommarkierten Didesoxynukleotide in die Matrizen-DNA (1 μg Plasmid oder 100 ng aufgereinigtes PCR-Produkt) erfolgte mit Hilfe des Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer) und 0,1 μmol spezifischem Primer der zu untersuchenden Gensequenz in 25 Zyklen von 96°C für 30 Sekunden, 45° für 15 Sekunden und 60°C für 4 Minuten. Nicht eingebaute markierte Nukleotide wurden durch Ethanol fällung entfernt, die Proben an der Luft getrocknet und schließlich in 25 μl HPLC- H_2O aufgenommen und auf dem Genetic Analyzer 310 analysiert.

II.2.10 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

II.2.10.1 Native Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden in 1-3 %igen nativen Agarosegelen und 1 x TBE-Laufpuffer aufgetrennt. Als DNA-Längenstandard wurde eine 100 bp-Leiter (Gibco) eingesetzt. Die DNA-Proben wurden mit $\frac{1}{5}$ Volumen Blaumarker versetzt, aufgetragen und bei 5 V/cm Laufstrecke aufgetrennt. Die aufgetrennten Fragmente wurden nach 15minütiger Inkubation in 0,3 %igem Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert und photographiert.

II.2.10.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Gesamt-RNA erfolgte in denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen (1 % Agarose (w/v), 6 % Formaldehyd (v/v) in 1 x MOPS). 10 µg Gesamt-RNA wurde in einem 20 µl-Ansatz in 6 % Formaldehyd, 50 % deionisiertem Formamid und 1 x MOPS aufgenommen und 5 Minuten bei 65°C denaturiert. Anschließend wurden die RNA-Proben mit $\frac{1}{5}$ Volumen Formaldehyd-Beladungspuffer versetzt, aufgetragen und bei 5 V/cm Laufstrecke aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1 x MOPS.

II.2.11 Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen

II.2.11.1 Ribonuclease Protection Assay

Zur Expressionsanalyse der in Tabelle 2.4 aufgeführten Gene auf RNA-Ebene wurde der RNase Protection Assay (RPA) durchgeführt. Der Nachweis bestimmter Transkripte beruht dabei auf der Synthese [α - 32 P]UTP markierter genspezifischer RNA-Sonden, durch in vitro-Transkription von Plasmiden, welche die entsprechenden cDNA-Sequenzen unmittelbar einem T7-Bakteriophagenpromotor nachgeschaltet tragen. Die RNA-Sonden werden anschließend von der Plasmid-DNA durch Deoxyribonuclease, von Protein durch Phenol/Chloroform-Extraktion und von nicht inkorporierten Nukleotiden durch Ethanol-Präzipitation in Anwesenheit von Ammoniumacetat gereinigt. Es folgt die Hybridisierung der markierten RNA-Sonden mit den zu untersuchenden Proben von 20 µg Gesamt-RNA mit anschließendem Ribonuclease-Verdau der überhängenden Nukleotide der RNA:RNA-Hybride und nicht gebundene RNA-Moleküle. Durch Proteinase K-Verdau wird die verwendete RNase abgebaut

und durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation die Hybride aufgereinigt. Nach Resuspension in Probenpuffer und Messung der Radioaktivität (cpm/ μ l) wurden gleiche Aktivitäten der Hybride in einem 6 %-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Sonde	Länge (nt)	
	unprotektierte Probe	protektierte Probe
h XIAP	435	406
h Survivin	390	361
h Cdk2	347	321
h NAIP	282	253
h MIHC/IAP1	231	203
h MIHB/IAP2	207	179
h DAP kinase	192	163
h DAP	174	145
h L32	141	113
h GAPDH	124	96

Tab. 2.3: Sonden-Set, welches im Ribonuclease Protection Assay verwendet wurde. Angegeben ist die Länge der unprotektierten Probe, die der RNA-Sonde mit angrenzenden Plasmidsequenzen entspricht und als Standard diente, sowie die Länge der protektierten Probe. nt = Nukleotide; h = human

II.2.12 Reverse Transkription (RT) und Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Bei der von MULLIS und FALOONA (1987) entwickelten automatisierten Polymerasekettenreaktion (PCR=*polymerase chain reaction*) handelt es sich um eine gezielte in vitro-Vervielfältigung von bestimmten DNA-Bereichen mit Hilfe einer DNA-Polymerase und genspezifischen Oligonukleotiden (Primer). In der Vorliegenden Arbeit wurde das Verfahren der RT-PCR eingesetzt, welche die Untersuchung von Mustern der Genexpression auf mRNA-Ebene ermöglicht.

II.2.12.1 Reverse Transkription (RT)

Zur Synthese von einzelsträngiger cDNA wurde 1 μ g Gesamt-RNA in 1 \times RT-Puffer mit 12,5 μ M jedes Deoxynukleotids, 5 pmol genspezifischen Primer oder 15 pmol random Primer, 10 U RNase Inhibitor RNAsin und 5 U AMV-Reverse Transkriptase in einem Volumen von 15 μ l

revers transkribiert. Die RT-Ansätze wurden für eine Stunde bei 50 °C (genspezifischer Primer) oder 55°C (random Primer) inkubiert.

II.2.12.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Bei der Amplifikation der in Tabelle 2.5 aufgelisteten genspezifischen cDNA-Abschnitte wurden 1,5 µl RT-Ansatz in 1 X PCR-Puffer, 12,5 µM jedes Deoxynukleotids, 12,5 pmol des spezifischen 5'- und 3'-Primer, wahlweise 5 µl Q-Solution und 1,25 U Taq-DNA-Polymerase in einem Reaktionsvolumen von 25 µl eingesetzt. Die PCR-Reaktionen verliefen in Abhängigkeit vom Amplikon unter den in Tabelle 2.5 angegebenen Bedingungen.

Amplikon	Annealing-Temperatur [°C]	Länge des Amplikon [bp]	Anzahl der Zyklen	PCR-Bedingungen
Apo2L/TRAIL	58	371, 328, 188	35	94 °C → 2 min. 94 °C → 30 sec. } ²⁵⁻ 52-64 °C → 1 min } ³⁵ 72 °C → 1 m 72 °C → 5 min
DcR 1	52	335	35	
DcR 2	56	381	35	
DR 4	55	299	35	
DR 5	55	207 (TRICK 2B) 120 (TRICK 2A)	35	
GAPDH	64	211	25	
Survivin	58	500 (Survivin-2B) 431 (Survivin) 329 (Survivin-ΔEx3)	35	

Tabelle 2.4: PCR-Reaktionen

II.2.13 Transfektion von eukaryotischen Zellen mittels Lipofektion

Zellen wurden mit FUGENE6 (Roche) entsprechend der Herstellerangaben transfiziert. Es wurde ein Verhältnis von 3 µl FUGENE6-Reagenz und 2 µg Plasmid-DNA gewählt.

II.2.14 Proteinchemische Methoden

II.2.14.1 Isolierung von Proteinen aus eukaryotischen Zellen

Zur Isolierung des Gesamt-Proteins aus eukaryotischen Zelllinien Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 50-250 µl Protein-Lysepuffer resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Lysat mit 14000 rpm für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der die zellulären Proteine enthaltende Überstand bis zum weiteren Gebrauch bei –20 °C aufbewahrt.

II.2.14.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des *Protein Assays* der Firma Bio-Rad nach der Methode von BRADFORD (1976). Hierfür wurden 5 µl Lysat in 795 µl H₂O mit 200 µl BioRad-Reagenz gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Erhöhung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs *Coomassie Brilliant Blue* nach Proteinbindung bei 595 nm wurde photometrisch bestimmt und die Proteinkonzentration anhand einer zuvor durch bekannte Mengen BSA erstellten Eichkurve ermittelt.

II.2.14.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-haltigen Polyacrylamidgelen erfolgte nach der Methode von LAEMMLI (1970). Die Proteine (20 µg) wurden vor dem Auftragen in gleichem Volumen SDS-Ladepuffer für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA bis zum Erreichen einer Trenntrecke von 8 cm. Als Molekulargewichtsstandard diente der *Low Range*-Standard der Firma BioRad.

II.2.14.4 Western Blot und Immundetektion von Proteinen

Der Transfer der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte in einer mit WB-Transferpuffer gefüllten Blottingkammer nach dem Prinzip des Naßblottings elektrophoretisch für 1 Stunde bei 100 V und 4 °C. Zur Kontrolle des erfolgreichen Transfers wurde die Nitrocellulosemembran in einer Ponceau-Rot-Lösung angefärbt. Nach Markierung der Molekulargewichtsstandards wurde die Membran mit H₂O

entfärbt und bei 4 °C über Nacht mit Blockade-Lösung abgesättigt. Anschließend erfolgte die Immundetektion des entsprechenden Proteins. Dazu wurde die Membran 1 Stunde mit dem in Blockade-Lösung entsprechend der erforderlichen Konzentration verdünnten, Primärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgten drei Waschungen mit Waschpuffer für jeweils 10 Minuten, um schließlich die Membran für 1 Stunde mit dem in Blockade-Lösung 1 : 2000 verdünnten HRP-gekoppelten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur zu inkubieren. Nach erneutem, dreimal 10-minütigem Waschen wurde die Membran für 5 Minuten in ECL-Lösung geschüttelt, in eine Klarsichtfolie eingeschweißt und ein Röntgenfilm exponiert.

II.2.15 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

1×10^5 Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und über Nacht inkubiert. Nach Transfektion der Zellen wurden diese für weitere 48 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 2 mal mit PBS gewaschen und mit -20°C kaltem Methanol für 15 Minuten fixiert. Nach erfolgter Fixierung folgte nach erneutem Waschschrift eine 10-minütige Permeabilisation in einer 0,1%-igen Triton X-100-Lösung, gefolgt von einer zwei-maligen PBS-Waschung. Danach wurden die Präparate mit Concanavalin A Alexa-564 (Molecular Probes) (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) beschichtet und 5 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert, erneut zweimal gewaschen und mit 6 μl Mounting-Medium bedeckt auf einem Objektträger fixiert.

Die Präparate wurden mit einem Inversionsmikroskop mit konfokalem Laserscanningzubehör analysiert. Bilder wurden auf zwei Kanälen bei 488 und 568 nm Excitationswellenlänge aufgenommen. Die Emission der Präparate wurde bei 530 (grünes Spektrum) und bei 590 nm (rotes Spektrum) aufgenommen. Eine Überlappung beider Signale ergibt dabei ein gelbes Signal.

III. ERGEBNISSE

III.1 Das TRAIL-System im Nierenzellkarzinom

III.1.1 Die Expression von TRAIL und seinen Rezeptoren

Zur Untersuchung der Bedeutung des TRAIL-Systems im humanen Nierenzellkarzinom wurde zunächst die Grundexpression von TRAIL, den agonistischen TRAIL-Rezeptoren vom Typ 1 und 2 sowie den antagonistischen TRAIL-Rezeptoren vom Typ 3 und 4 auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR in 31 Nierenkarzinom-Zelllinien ermittelt. Wie aus **Abbildung 3.1** ersichtlich ist, waren der agonistische TRAIL-Rezeptor vom Typ 1 wie auch der antagonistische TRAIL-Rezeptor vom Typ 4 auf mRNA-Ebene in 30 von 31 Zelllinien detektierbar. Der agonistische TRAIL-Rezeptor vom Typ 2 (TRICK 2A) und seine alternative Spleißvariante TRICK 2B konnten in allen (n = 31) Zelllinien amplifiziert werden. Dagegen waren nur schwache Signale für das TRAIL-R3-Transkript in 16 Zelllinien nachweisbar. Die Amplifikation von TRAIL in allen 31 Zelllinien ergab zusätzlich neben dem erwarteten Amplikon von 371 bp zwei kleinere Fragmente, die in den Klonierungsvektor pGEM-T ligiert, kloniert und anschließend sequenziert wurden. Beide Fragmente wurden mittels BLASTN-Identitätsvergleich als Abschnitte der TRAIL-cDNA (Acc.No. U37158) identifiziert. Die weitere Untersuchung der identifizierten TRAIL-cDNA-Formen TRAIL- β und - γ , wurde wie in Kap. III.1.2 beschrieben, über Datenbankanalysen und spezielle Software durchgeführt. Aufmerksamkeit erweckte ein 266 bp großes PCR-Produkt, welches im Rahmen der TRAIL-R4-Amplifikation in der Zelllinie clearCa-19 nach gelelektrophoretischer Auftrennung sichtbar wurde. Auch diese TRAIL-R4 β -cDNA wurde nach Gelextraktion kloniert, sequenziert und über BLASTN-Suche analysiert.

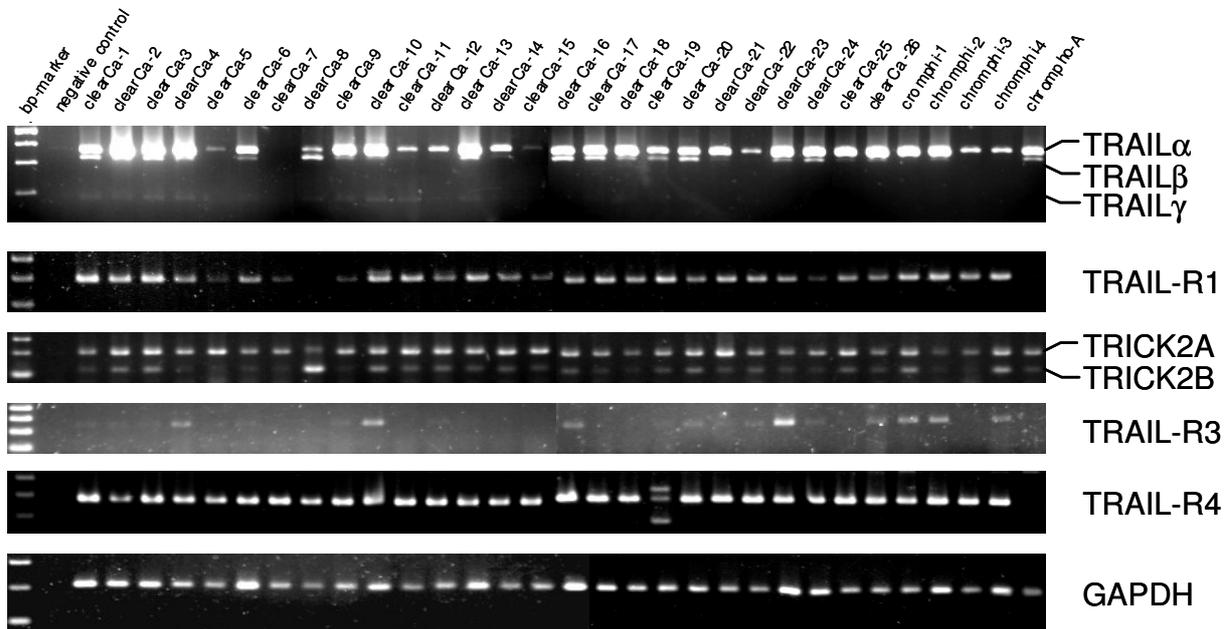


Abb. 3.1: Expression TRAIL- α , - β , - γ und seinen Rezeptoren in Nierenkarzinom-Zelllinien.

Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse ließ sich eine Expression von TRAIL auf Proteinebene in 14 von 16 Nierenkarzinom-Zelllinien nachweisen (**Abb. 3.2**). Hierbei konnten die in Abschnitt III.1.2 beschriebenen alternativen Spleißvarianten mit Hilfe des Anti-TRAIL-mAK (Pharmingen) nicht detektiert werden. Insbesondere in den vier untersuchten klarzelligen Zelllinien clearCa-1, -4, -5, -11, -17, -26, den chromophilzelligen und der chromophoben Nierenkarzinom-Zelllinie stimmt die Expressionsstärke auf mRNA-Ebene mit der Signalstärke auf Proteinebene tendenziell überein.

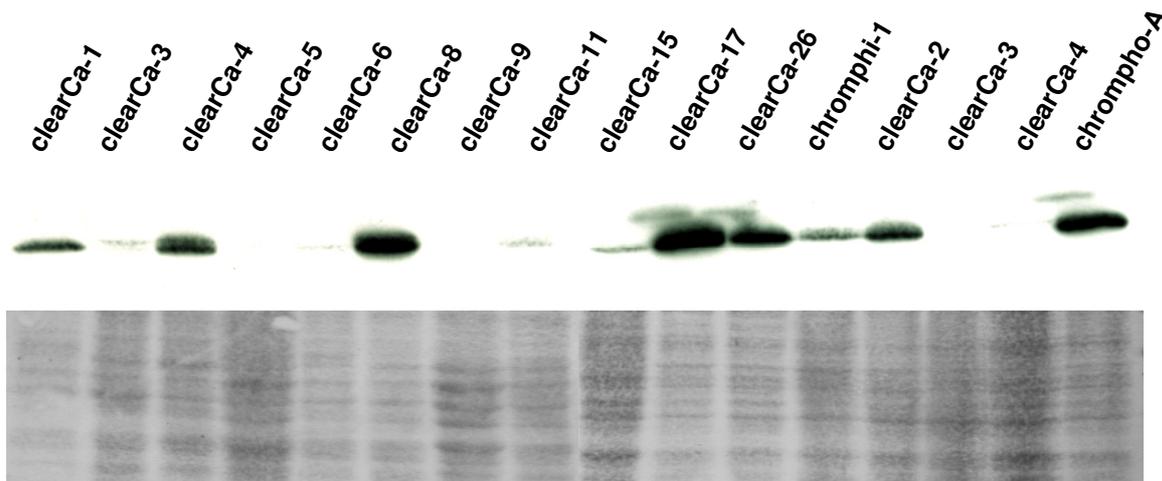


Abb. 3.2: Expression des TRAIL-Proteins in Nierenkarzinom-Zelllinien.

III.1.2 Identifizierung alternativer Spleißvorgänge von TRAIL und TRAIL-R4

III.1.2.1 Analyse der genomischen Organisation von TRAIL

Die Basensequenz der amplifizierten kleineren PCR-Produkte von TRAIL ließ ein alternatives Spleißen der prä-mRNA vermuten. Die genomische Sequenz des Liganden, die zum einen über die Exon-Intron-Organisation und zum anderen über potentielle Spleißdonor- und -akzeptorstellen hätte Auskunft geben können, war zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen nicht publiziert. Daher wurde die TRAIL-mRNA (Acc.No. U37518) über die erweiterte BLAST-Datenbank-Suche gegen genomischen Sequenzen abgeglichen, um homologe genomische Klone zu identifizieren. Aus der Datenbank-Analyse ergab sich eine 100 %-ige Übereinstimmung von fünf Fragmenten des Homo sapiens Chromosom 3-Klons hRPK.44 A (Acc.No. AC007051), die überlappend zusammengesetzt die TRAIL-mRNA bildeten (**Abb. 3.3 A**). Somit wird TRAIL durch 5 Exons codiert (**Abb. 3.3 B**), wobei das Exon 1 für den intrazellulären Bereich und die hydrophobe transmembranäre Domäne kodiert, während die Exons 2-5 die Information für den extrazellulären Bereich des TRAIL-Proteins enthalten. Insbesondere die für die Homotrimerisation entscheidende Aminosäure Cystein in Position 230 des Liganden (TRABZUNI et al., 2000) wird durch die Nukleotide 148662-148664 des Exons 5 konserviert.

A)

```

131761 ..... acagttgcag gttcaataga tgtgggtggg gccaaaggcca cagaaccag
131821 aaaaacaact cattcgcttt caTTTCCTCA CTGACTATAA AAGAATAGAG AAGGAAGGGC
131881 TTCAGTGACC GGCTGCCTGG CTGACTTACA GCAGTCAGAC TCTGACAGGA TCATGGCTAT ex1
131941 GATGGAGGTC CAGGGGGGAC CCAGCCTGGG ACAGACCTGC GTGCTGATCG TGATCTTCAC
132001 AGTGCTCCTG CAGTCTCTCT GTGTGGCTGT AACTTACGTG TACTTTACCA ACGAGCTGAA
132061 GCAGgtcagt gcagtgagc gcaactcagtc ttcgaggcgc ttagcaaatg tctgggttacc
132121 tgcttctttg catgtcagct tgcccctctc tgaagacttt cctgcttctc .....
140281 caaaatattg tgttatattc catctcaacc cagATGCAGG ACAAGTACTC CAAAAGTGGC
140341 ATTGCTTGTT TCTTAAAAGA AGATGACAGT TATTGGGACC CCAATGACGA AGAGAGTATG ex2
140401 AACAGCCCCT GCTGGCAAGT CAAGTGGCAA CTCCGTCAGC TCGTTAGAAA Ggtaggtaac
140461 ctaccaggt gacctacca gcaggcggag aaggccagaa gaattcctta .....
143581 gagccatagg cattctatag tcagtttaaa tttttaggga aattaacaag cttttattcaa
143641 taatatttgc agATGATTTT GAGAACCTCT GAGGAAACCA TTTCTACAGT TCAAGtagt ex3
143701 atcttttttg ttgttatttt aatttttttac tgtcatcttc atgacaggt .....
145921 cctatgaaga gcaaggtatt ggagaactag tttggcaagt gttgatgacc cttttatcatt
145981 tctcttttag gAAAAGCAACA AAATATTTCT CCCCTAGTGA GAGAAAGAGG TCCTCAGAGA ex4
146041 GTAGCAGCTC ACATAACTGG GACCAGAGGA AGAAGCAACA CATTGTCCTC TCCAAgtaag
146101 agaaacaaca aataagtgac ttaagggaaa ataatggaag gattgtgcca .....
148321 gctgcaaaaa agctccttgc tttgctacaa attcccttct gttaacgctc tttctctcta
148381 aatttcttac agACTCCAAG AATGAAAAGG CTCTGGGCCG CAAATAAAC TCCTGGGAAT
148441 CATCAAGGAG TGGGCATTCA TTCCTGAGCA ACTTGCACCT GAGGAATGGT GAACTGGTCA
148501 TCCATGAAAA AGGTTTTCAC TACATCTATT CCCAAACATA CTTTCGATTT CAGGAGGAAA
148561 TAAAAGAAAA CACAAAGAAC GACAAACAAA TGGTCCAATA TATTTACAAA TACACAAGTT ex5
148621 ATCCTGACCC TATATTGTTG ATGAAAAGTG CTAGAAATAG TTGTTGGTCT AAAGATGCAG
148681 AAATATGGACT TATTCCATC TATCAAGGGG GAATATTTGA GCTTAAGGAA AATGACAGAA
148741 TTTTTGTTC TGTAACAAAT GAGCACTTGA TAGACATGGA CCATGAAGCC AGTTTTTTTTG
148801 GGGCCTTTTT AGTTGGCTAA ctgacctgga aagaaaaagc aataacctca aagtgactat
148861 tcagttttca ggatgatata ctatgaagat gtttcaaaaa atctgaccaa aacaacaaaa
148921 cagaaaacag aaaacaaaa aacctctatg caatctgagt agagcagcca caaccaaaaa
148981 attctacaac acacactgtt ctgaaagtga ctcaattatc ccaagagaat gaaattgctg
149041 aaagatcttt caggactcta cctcatatca gtttgcttag agaaatctag .....

```

B)



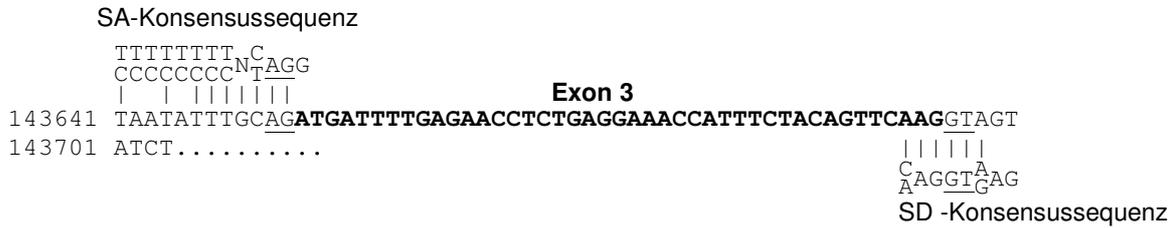
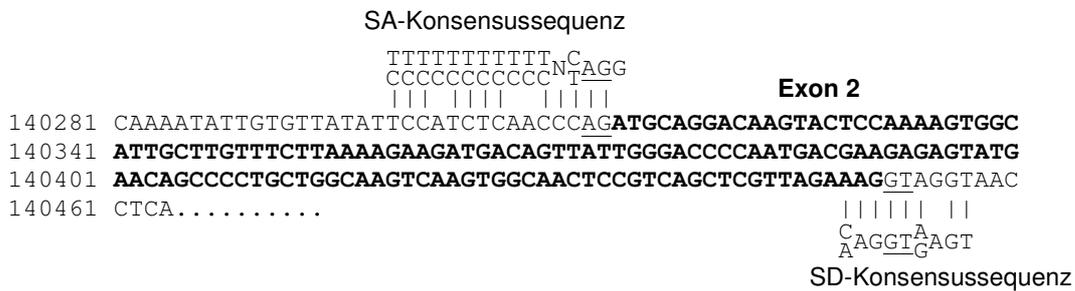
Abb. 3.3: Genomische Organisation des apoptoseinduzierenden TRAIL/Apo2L-Liganden: A) Hervorgehoben sind die der TRAIL-mRNA entsprechenden Bereiche im hRPK.44_A_1-Klon (Acc.No. AC007051), die den Exons 1-5 entsprechen **B)** Graphische Darstellung der genomischen Organisation des TRAIL-Liganden

III.1.2.2 Nachweis des alternativen Spleißens der TRAIL-prä-mRNA

Anhand der identifizierten genomischen TRAIL-Sequenz war es nun möglich mit Hilfe des Programms SIGNAL des PC/GENE-Paketes potentielle Spleißdonor- und Spleißakzeptorstellen an den Intron-Exon- und Exon-Intron-Grenzen nachzuweisen (**Abb. 3.4 A**). Die Analyse zeigte, daß sowohl Exon 2 als auch Exon 3 von einer potentiellen Spleißdonor- und

Spleißakzeptorseite flankiert werden, die mit der Konsensussequenz herkömmlicher Spleißdonorstellen ([C/A] AG GT [A/G] AGT) und Spleißakzeptorstellen ([T/C]₁₁ N [C/T] AG G) übereinstimmen (MOUNT, 1982; STADEN, 1984). Diese Daten zeigen, daß die posttranskriptionelle Prozessierung der TRAIL-Vorläufer-mRNA zur Synthese von drei alternativen Spleißvarianten TRAIL- α , TRAIL- β und TRAIL- γ führt (Abb 3.4. B).

A)



B)

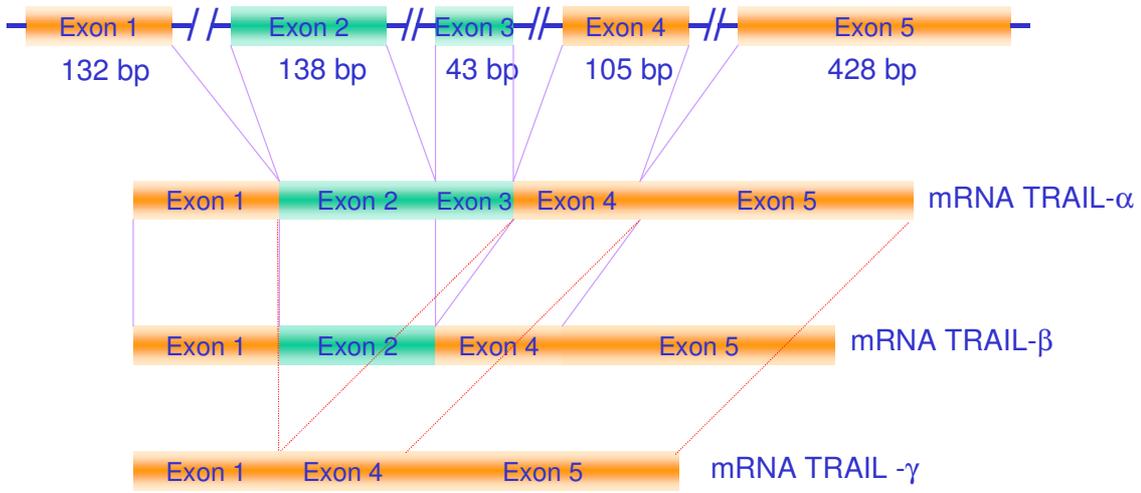


Abb. 3.4: Dargestellt sind die Exon 2 und Exon 3 flankierenden Spleißdonor- und -akzeptorstellen A) und die daraus resultierenden TRAIL mRNAs B): Fett dargestellt ist das entsprechende Exon. SA = Spleißakzeptor, SD = Spleißdonor.

III.1.2.3 Analyse des TRAIL-Proteins und seiner Isoformen mittels prädiktiver Algorithmen

Die elektronische Translation von TRAIL und seinen neuen Spleißvarianten mit Hilfe des Programms ClustalW (**Abb. 3.5 A**) zeigt, daß der Spleißvorgang in beiden alternativen prä-mRNA-Varianten durch den Verlust von Exon 3 einen Leserasterverschub mit neuem Stop-Codon generiert. Folge ist eine ausgedehnte Modifikation im Bereich der extrazellulären Domäne sowohl von TRAIL- β als auch von TRAIL- γ . Aus dieser Modifikation resultiert das 98 Aminosäuren umfassende TRAIL- β und das 52 Aminosäuren lange TRAIL- γ (**Abb 3.5 B**). Darüber hinaus identifizierte die Computeranalyse mit Hilfe des PSORT II-Programms im C-Terminus von TRAIL- β und - γ die Aminosäuresequenz KIFL, ein KKXX-ähnliches Motiv, das als Retentionssignal der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) fungieren kann. Mit Hilfe der PROSITE-Software identifizierten wir zusätzlich eine potentielle Proteinkinase C-Phosphorylierungsregion zwischen den AS 92-94 von TRAIL- β und AS 46-48 von TRAIL- γ , die unmittelbar an die potentielle ER-Membran-Retentions Signalsequenz grenzt. TRAIL- β weist schließlich eine potentielle cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinase Phosphorylierungsstelle zwischen AS 89-92 auf.

A)

```

TRAIL $\gamma$       1  MAMMEVQGGPSLGQTCVLIVIFTVLLQSLCVAVTYVYFTNELKQKSNKIFLP-----
TRAIL $\beta$      1  MAMMEVQGGPSLGQTCVLIVIFTVLLQSLCVAVTYVYFTNELKQMDKYSKSGIACFLKE
TRAIL $\alpha$     1  MAMMEVQGGPSLGQTCVLIVIFTVLLQSLCVAVTYVYFTNELKQMDKYSKSGIACFLKE

TRAIL $\gamma$     61  -----
TRAIL $\beta$      61  DDSYWDPNDEESMNSPCWQVKWQLRQLVRKSNKIFLP-----
TRAIL $\alpha$     61  DDSYWDPNDEESMNSPCWQVKWQLRQLVRKMILRTSEETISTVQEKQONI SPLVREGRPQ

TRAIL $\gamma$     121 -----
TRAIL $\beta$      121 -----
TRAIL $\alpha$     121  RVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKG

TRAIL $\gamma$     181 -----
TRAIL $\beta$      181 -----
TRAIL $\alpha$     181  FYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKMQVQYIYKYTSYDPDILLMKSARNSCWSKDAEYGLY

TRAIL $\gamma$     241 -----
TRAIL $\beta$      241 -----
TRAIL $\alpha$     241  SIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVG

```

B)

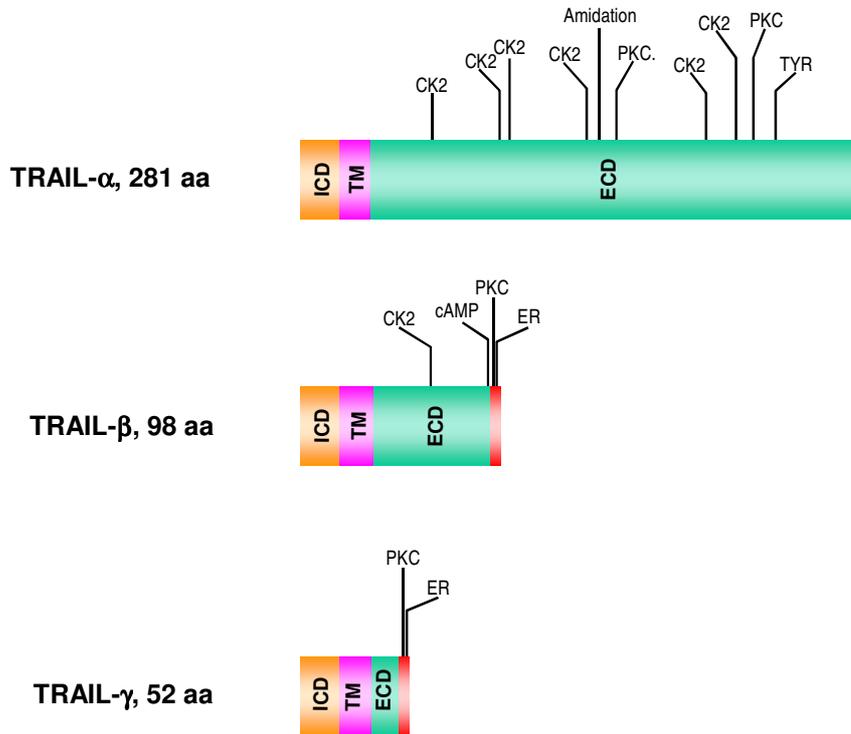


Abb. 3.5: Sequenzabgleich der drei TRAIL-Varianten auf Proteinebene mit ClustalW: A) Hochkonservierte Aminosäuren sind schwarz, schwach konservierte Aminosäuren sind grau unterlegt. **B)** ICD = intrazelluläre Domäne, ECD = extrazelluläre Domäne, TM = transmembranäre Domäne.

Aus der cDNA Sequenz von TRAIL kann ein Protein von 31 kDa mit einem pI von 7.4 abgeleitet werden. TRAIL- α besteht überwiegend aus geladenen, polaren und hydrophoben Aminosäuren (**Tab. 3.1**).

Aminosäure	Anzahl	Häufigkeit [%]
Geladen	90	32.03
Sauer	32	11.39
Basisch	32	11.39
Polar	94	33.45
Hydrophob	84	29.89

Tabelle 3.1: Aminosäurezusammensetzung des TRAIL α -Proteins. Die Analyse wurde mit Hilfe des DNASTar-Programms Protean modifiziert nach Nishikawa & Ooi ermittelt.

Die Ergebnisse der Protean-Computeranalyse der DNASTar Software zur Sekundärstruktur sind in der folgenden **Abbildung 3.6** dargestellt.

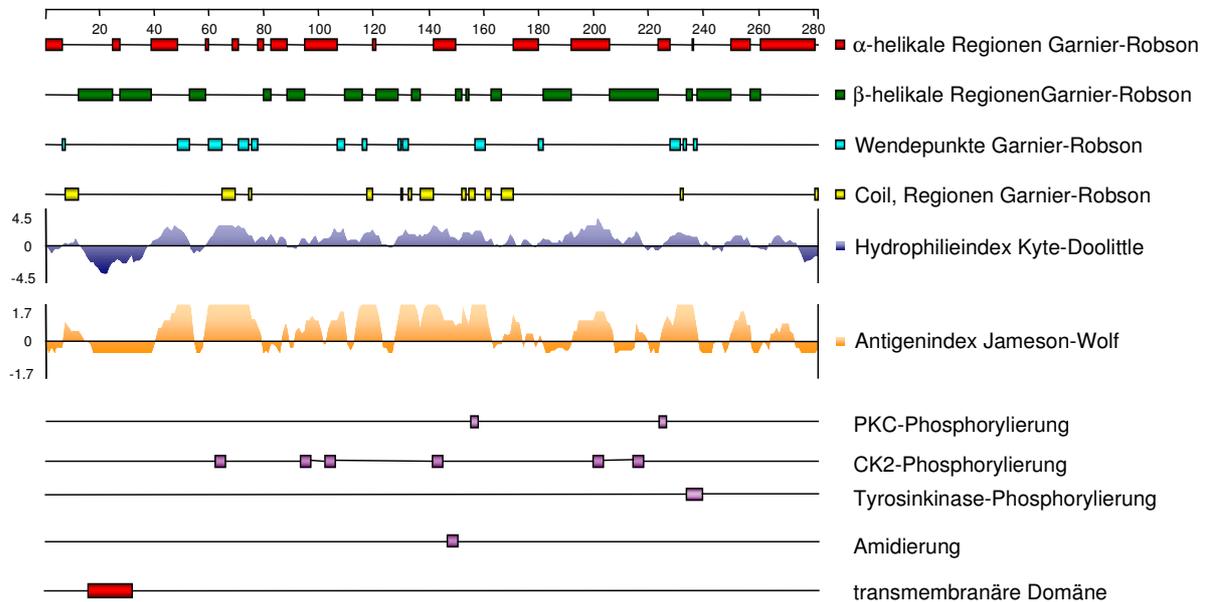


Abb. 3.6: Strukturelle Charakteristika der TRAIL- α -Isoform: Dargestellt sind die Aminosäurezusammensetzung und strukturellen Charakteristika, die sich aus den Computeranalysen der von der cDNA mit ClustalW abgeleiteten Proteinsequenz ergaben.

Insgesamt setzt sich die Sekundärstruktur des TRAIL- α -Proteins aus 16 α -helikalen und 16 β -helikalen Regionen zusammen. Nach dem Hydrophiliediagramm nach KYLE-DOOLITTLE (1982) besitzt das Protein eher einen hydrophilen Charakter. Hydrophobe Anteile sind im Bereich der nach KLEIN et al. (1985) identifizierten transmembranären Domäne zwischen den Aminosäuren 17-33 und im C-Terminus lokalisiert. Nach von HEIJNE et al. (1986) enthält das Protein keine Signalsequenz.

Die 98 Aminosäuren umfassende TRAIL- β -Isoform weist einen pI von 6.41 und eine errechnete molekulare Masse von ca. 11 kDa auf. Nach dem Hydrophiliediagramm besteht es mit 33,67 % eine zur klassischen TRAIL-Variante vergleichbare relative Häufigkeit von hydrophoben Aminosäuren (**Tab. 3.2 u. Abb. 3.7**).

Aminosäure	Anzahl	Häufigkeit [%]
Geladen	28	28.57
Sauer	10	10.20
Basisch	10	10.20
Polar	32	32.65
Hydrophob	33	33.67

Tabelle 3.2: Aminosäurezusammensetzung des TRAIL- β -Proteins. Die Analyse wurde mit Hilfe des DNASTar-Programms Protean modifiziert nach Nishikawa & Ooi ermittelt.

Hier befindet sich der größte Anteil der hydrophoben Aminosäuren im Bereich der transmembranären Domäne. Es bilden sich 8 α -helikale und 6 β -helikale Bereiche. Somit ist das Verhältnis der Helices zugunsten der α helikalen Regionen verschoben. Auffällig ist, daß die letzte C-terminale β -helikale Region durch den Leserasterverschub gegenüber der korrespondierenden Region im TRAIL-Protein trunkiert ist. Abgesehen von den Phosphorylierungsstellen und der beschriebenen ER-Membran-Retentionssignalsequenz bleiben die übrigen Modifikationen erhalten.

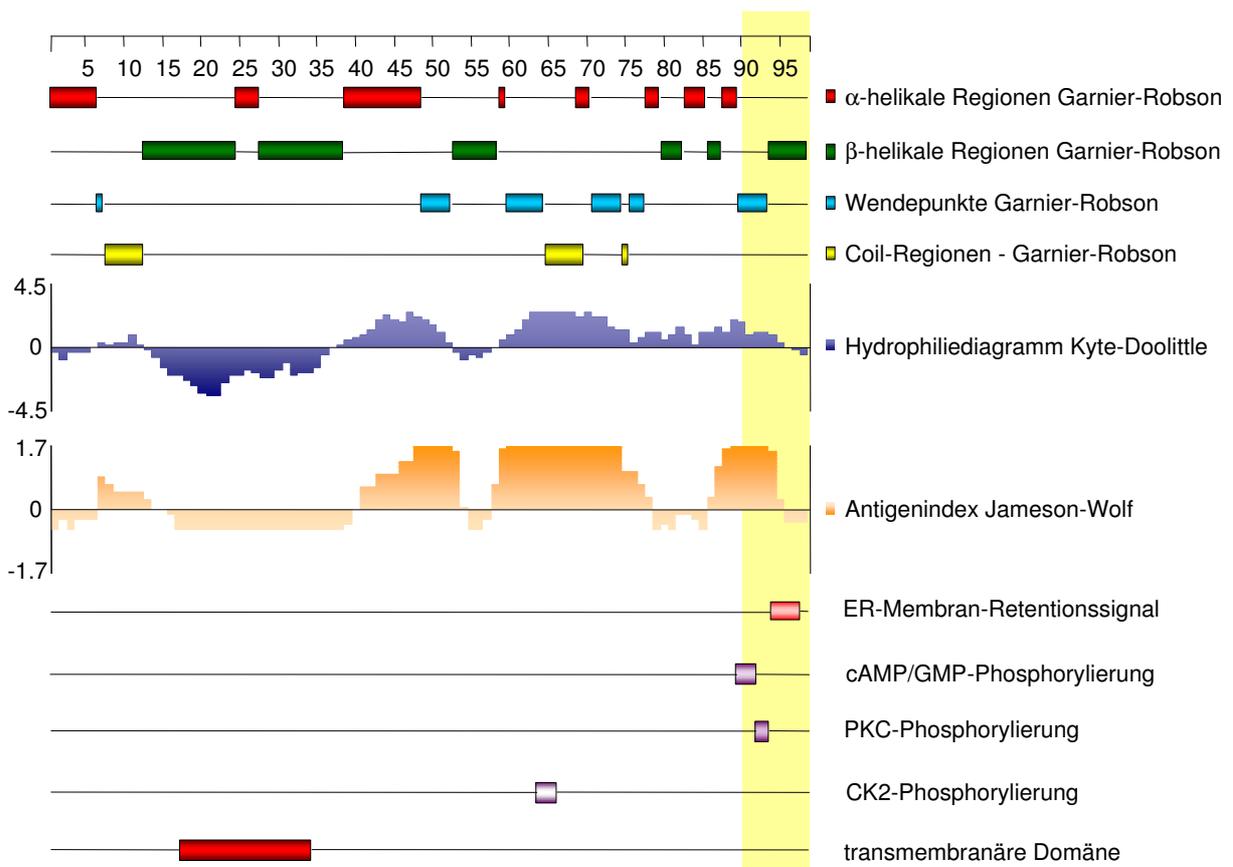


Abb. 3.7: Strukturelle Charakteristika der TRAIL β -Isoform: Dargestellt sind die Aminosäurezusammensetzung und strukturellen Charakteristika, die sich aus den Computeranalysen des von der cDNA mit ClustalW abgeleiteten Proteinsequenz ergaben. Unterlegt ist der modifizierte C-Terminus.

Das 52 Aminosäuren umfassende TRAIL- γ setzt sich wiederum zu gleichen Anteilen aus α -helikalen und β -helikalen Regionen zusammen. Es besitzt einen pI von 7.99 und weist gegenüber den beiden anderen TRAIL-Formen einen hydrophoberen Charakter auf (**Tab. 3.3 u. Abb 3.8**). Demgegenüber ist die relative Häufigkeit geladener, saurer oder basischer Aminosäuren reduziert.

Aminosäure	Anzahl	Häufigkeit [%]
Geladen	9	17.31
Sauer	2	3.85
Basisch	3	5.77
Polar	17	32.69
Hydrophob	22	42.31

Tabelle 3.3: Aminosäurezusammensetzung des TRAIL- γ -Proteins. Die Analyse wurde mit Hilfe des DNASTAR-Programms Protean modifiziert nach Nishikawa & Ooi ermittelt.

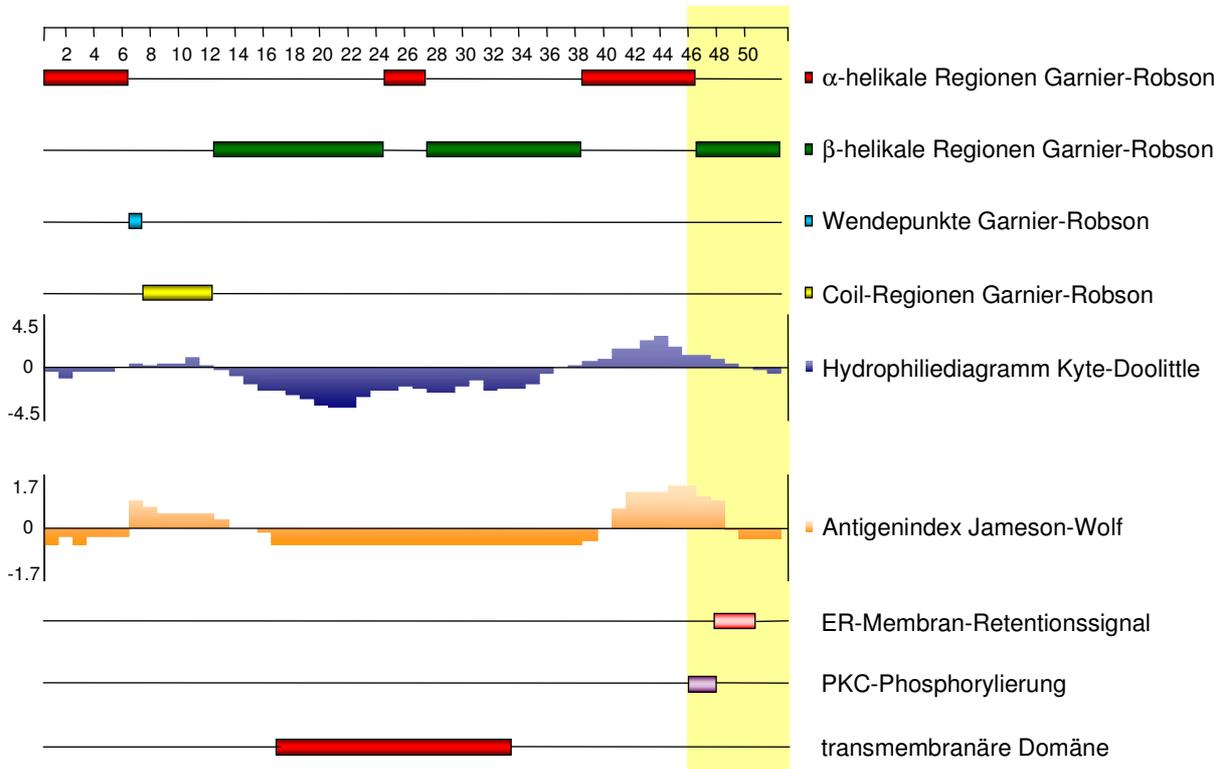


Abb. 3.8: Strukturelle Charakteristika der TRAIL- γ -Isoform: Dargestellt sind die Aminosäurezusammensetzung und strukturellen Charakteristika, die sich aus den Computeranalysen des von der cDNA mit ClustalW abgeleiteten Proteinsequenz ergaben. Unterlegt ist der modifizierte C-Terminus.

III.1.2.4 Subzelluläre Lokalisation der TRAIL-Varianten

TRAIL weist eine hydrophobe transmembranäre Domäne zwischen den AS 17-33 auf, die vermuten läßt, daß dieses Protein auf der Zelloberfläche als membranintegriertes Protein exprimiert wird. Um die subzelluläre Lokalisation von TRAIL und den beiden alternativen Spleißvarianten zu überprüfen, wurde zunächst mit Hilfe der PSORT II-Datenbankanalyse eine Vorhersage der Lokalisation der TRAIL-Varianten durchgeführt. Überraschenderweise sagte diese Computeranalyse für alle drei TRAIL-Spleißvarianten eine vorwiegende Lokalisation in zytoplasmatischen Kompartimenten voraus (**Tab. 3.4**). Danach scheint auch nur ein geringer Anteil an Protein im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert zu sein, wobei die PSORT II-Analyse im Bereich des regulären TRAIL-Proteins im Gegensatz zu beiden alternativen TRAIL-Spleißvarianten keine ER-Membranretentions-Signale identifizierte.

vorhergesagte Lokalisation	TRAIL- α	TRAIL- β	TRAIL- γ
	%	%	%
zytoplasmatisch	34.8	43.5	43.5
nukleär	21.7	8.7	8.7
mitochondrial	17.4	30.4	30.4
Vesikel des sekretorischen Systems	8.7	4.3	4.3
endoplasmatisches Retikulum	8.7	8.7	8.7
Golgi-Apparat	4.3		
peroxisomal	4.3	4.3	4.3

Tabelle 3.4: Ergebnisse der PSORT II-Analyse

Um die vorausgesagte subzelluläre Lokalisation von TRAIL und seinen Spleißvarianten zu überprüfen, wurden transformierte, embryonale Nierenzelllinien HEK293T mit EGFP-fusionierten TRAIL-Varianten transfiziert. Aufgrund der Computeranalysen wurde zur Darstellung des endoplasmatischen Retikulums eine spezifische fluoreszierende Färbung mit Concanavalin A Alexa-564, wie sie bereits unter Abschnitt II.2.16 beschrieben wurde,

durchgeführt, um eine mögliche Retention im Bereich des endoplasmatischen Retikulums von TRAIL- β und - γ zu kennzeichnen. Interessanterweise zeigte TRAIL, obwohl es über eine hydrophobe transmembranäre Domäne zwischen den AS 17-33 verfügt, ein zytoplasmatisches und auch vereinzelt endoplasmatisches Verteilungsmuster (**Abb 3.9**). Ein vergleichbares Muster in der subzellulären Lokalisation wies auch TRAIL- β auf. Im Gegensatz zu diesen beiden TRAIL-Varianten erkennt man für TRAIL- γ (**Abb. 3.9**), welches die Hauptbestandteile seiner extrazellulären Domäne verloren hat, eine Lokalisation in der äußeren Zellmembran und eine starke perinukleäre und endoplasmatische Akkumulation.

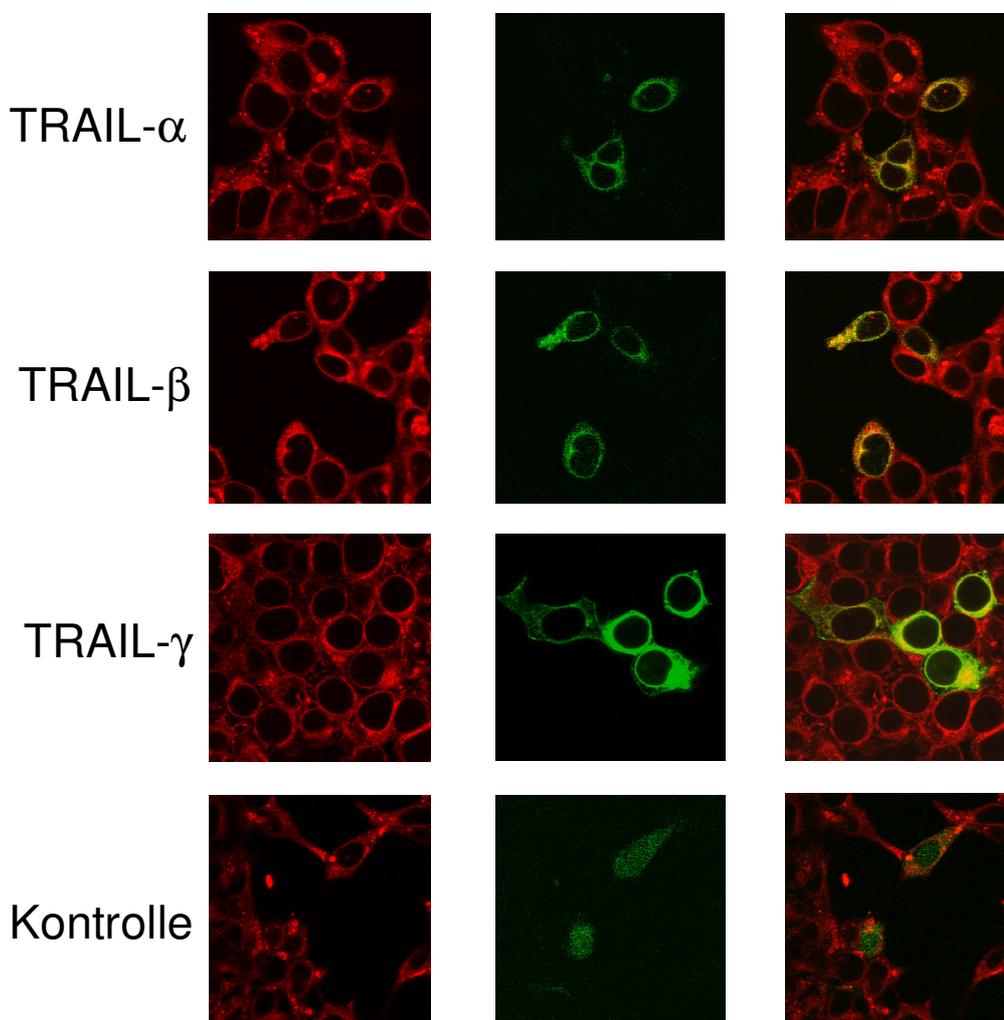


Abb. 3.9: Subzelluläre Lokalisation der TRAIL-GFP-Fusionsproteine. HEK293T Zellen wurden transient mit den TRAIL-Konstrukten(grün) transfiziert und für 48 h inkubiert. Das Endoplasmatische Retikulum

III.1.2.5 Analyse des TRAIL-R4- α -Proteins und seiner Form TRAIL-R4- β

Wie bereits unter Abschnitt III.1.1. bereits beschrieben, wurde durch Sequenzanalysen eine TRAIL-R4-Variante mit Verlust der Basen 258-372 identifiziert. Wir bezeichneten daher die klassische TRAIL-R4-Isoform TRAIL-R4- α und die erstmals nachgewiesene Isoform als TRAIL-R4- β . Die elektronische Translation der mRNA von TRAIL-R4- α und - β zeigt die Folgen der Deletion des codierenden Bereichs für die Primärstruktur des Proteins (**Abb.3.10**). Besonders auffällig ist die trunkeerte, cysteinreichen Domäne (tCRD) durch den Verlust von 38 Aminosäuren. Es resultiert ein verkürztes Protein, welches sich aus 348 Aminosäuren zusammensetzt.

TRAIL-R4 β	1	MGLWGQSVPTASSARAGRYPGARTASGTRPWLLDPKILKFVVFIVAVLLPVRVDSATIPR
TRAIL-R4 α	1	MGLWGQSVPTASSARAGRYPGARTASGTRPWLLDPKILKFVVFIVAVLLPVRVDSATIPR
TRAIL-R4 β	61	QDEVPPQQTIVAPQQQRSLKKEECPAG-----
TRAIL-R4 α	61	QDEVPPQQTIVAPQQQRSLKKEECPAGSHRSEYTGACNPCTEGVDYTIASNNLPSCLLCTV
TRAIL-R4 β	87	----QTNKSSCTTTRDITVCQCEKGSFQDKNSPEMCRCTCRTGCP RGMVKVSNCTPRSDIK
TRAIL-R4 α	121	CKSGQTNKSSCTTTRDITVCQCEKGSFQDKNSPEMCRCTCRTGCP RGMVKVSNCTPRSDIK
TRAIL-R4 β	143	KNESAASTGKTPAAEETVTTILGMLASPHYHLIIIVVLVILAVVVVGFSCRKKFISYL
TRAIL-R4 α	181	KNESAASTGKTPAAEETVTTILGMLASPHYHLIIIVVLVILAVVVVGFSCRKKFISYL
TRAIL-R4 β	203	KGICSGGGGGPERVHRVLFRRRSCPSRVPGAEDNARNETLSNRYLQPTQVSEQEIQGQEL
TRAIL-R4 α	241	KGICSGGGGGPERVHRVLFRRRSCPSRVPGAEDNARNETLSNRYLQPTQVSEQEIQGQEL

TRAIL-R4- α , 386 aa



TRAIL-R4- β , 348 aa



Abb. 3.10: Protein-Alignment der beiden TRAIL-R4-Varianten. Der Sequenzabgleich der beiden Varianten wurde mit Hilfe des Programms ClustalW durchgeführt. Dargestellt sind die AS 1-241 der ACC-No. AF029761 der bekannten TRAIL-R4-Isoform, wobei hoch-konservierte Aminosäuren schwarz unterlegt sind. SS = Signalsequenz; CRD = cysteinreiche Domäne; tCRD = trunkeerte CRD; TM = transmembranäre Domäne; TDD = trunkeerte Todesdomäne.

Aus der cDNA Sequenz von TRAIL-R4 kann, modifiziert nach Nishikawa und Ooi (1987), ein Protein mit einer molekularen Masse von 41,8 kDa abgeleitet werden. Das TRAIL-R4-Protein weist einen isoelektrischen Punkt von 6,38 auf und setzt sich zu größten Anteilen aus geladenen, polaren und hydrophoben Aminosäuren zusammen (**Tab.3.5**).

Aminosäure	Anzahl	Häufigkeit [%]
Geladen	119	30.83
Sauer	45	11.66
Basisch	43	11.14
Polar	123	31.87
Hydrophob	116	30.05

Tabelle 3.5: Aminosäurezusammensetzung des TRAIL-R4 α -Proteins. Die Analyse wurde mit Hilfe des DNASTAR-Programms Protean modifiziert nach Nishikawa & Ooi ermittelt.

Die Sekundärstruktur (**Abb. 3.11**) beinhaltet 14 α -helikale Regionen und 30 β -helikale Regionen und weist 19 Coil-Regionen auf. Nach dem Hydrophiliediagramm nach KYTE-DOOLITTLE (19) besitzt DcR2 einen hydrophilen Charakter. Größere hydrophobe Abschnitte erstrecken sich über die transmembranäre Domäne und in der Nähe des N-Terminus, in der extrazellulären Domäne. Mit Hilfe der PROSITE-Analyse konnten 3 potentielle ASN-Glykosylierungsstellen, 20 mögliche Phosphorylierungsstellen (cAMP, PKC, CK2) und 8 Myristylierungsstellen sowie ein potentielles ATP/GTP-Bindungsmotiv identifiziert werden.

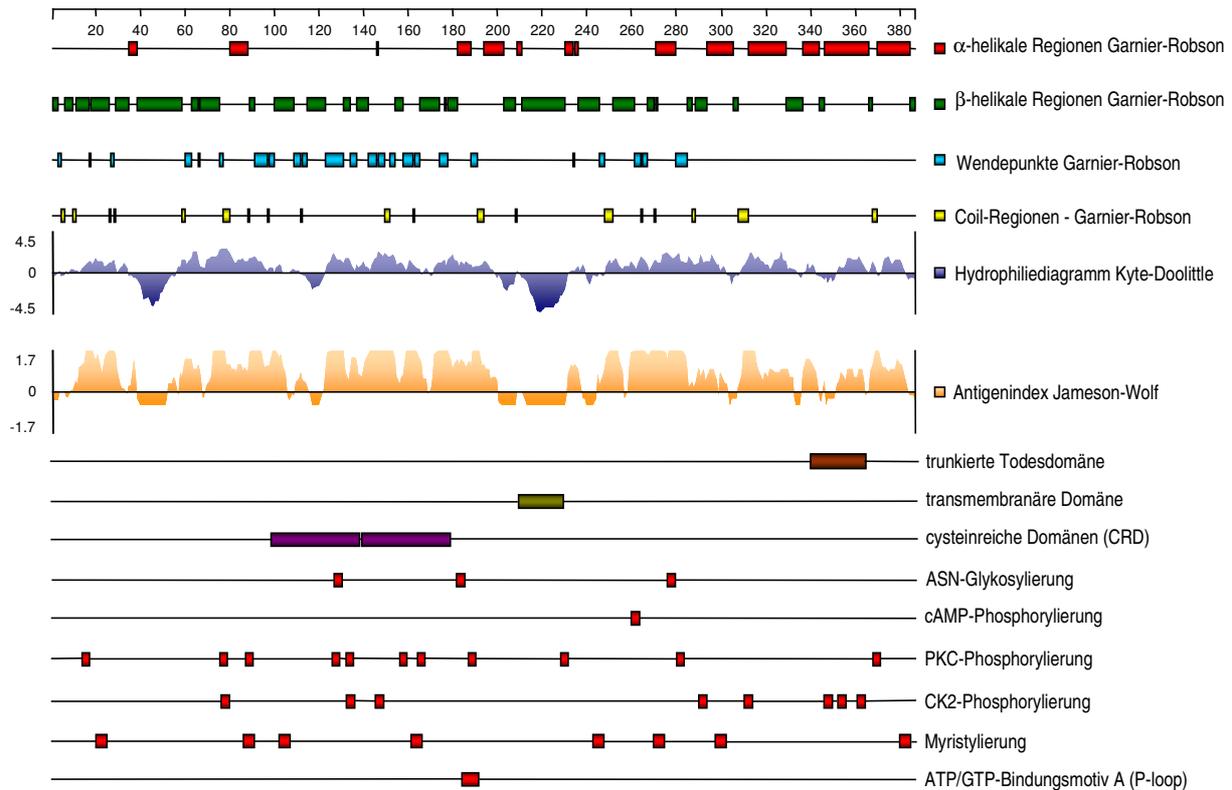


Abb. 3.11: Strukturelle Merkmale des TRAIL-R4- α -Proteins. Abgebildet sind die Ergebnisse der Computeranalysen zur Proteinstruktur mit Hilfe der Programme DNASTar (Protean) und PROSITE.

Die cDNA von TRAIL-R4- β läßt ein Protein von 37,6 kDa mit einem pI von 6.59 ableiten. TRAIL-R4- β besteht, ebenso wie die klassische Variante, zum größten Teil aus geladenen, polaren und hydrophoben Aminosäuren (**Tab. 3.6**).

Aminosäure	Anzahl	Häufigkeit [%]
Geladen	106	30.72
Sauer	42	12.17
Basisch	41	11.88
Polar	104	30.14
Hydrophob	107	31.01

Tabelle 3.6: Aminosäurezusammensetzung des TRAIL-R4 β -Proteins. Die Analyse wurde mit Hilfe des DNASTar-Programms Protean modifiziert nach Nishikawa & Ooi ermittelt.

Im Hydrophiliediagramm nach Kyte-Doolittle erkennt man den insgesamt eher hydrophilen Charakter von TRAIL-R4- β (Abb.3.12). Die Sekundärstruktur (Abb.3.12) wird von 14 α -helikalen und 27 β -helikalen Regionen gebildet. TRAIL-R4- β weist den Verlust von 3 Coil-Regionen im Bereich der ehemaligen cysteinreichen Domäne auf. Die potentiellen ASN-Glykosylierungs-, die cAMP- und CK2- Phosphorylierungsstelle sowie das ATP/GTP-Bindungsmotiv bleiben im Protein von TRAIL-R4- β erhalten. Dagegen kommt es zum Verlust einer PKC-Phosphorylierungsstelle und zwei potentieller Myristylierungsbereiche.

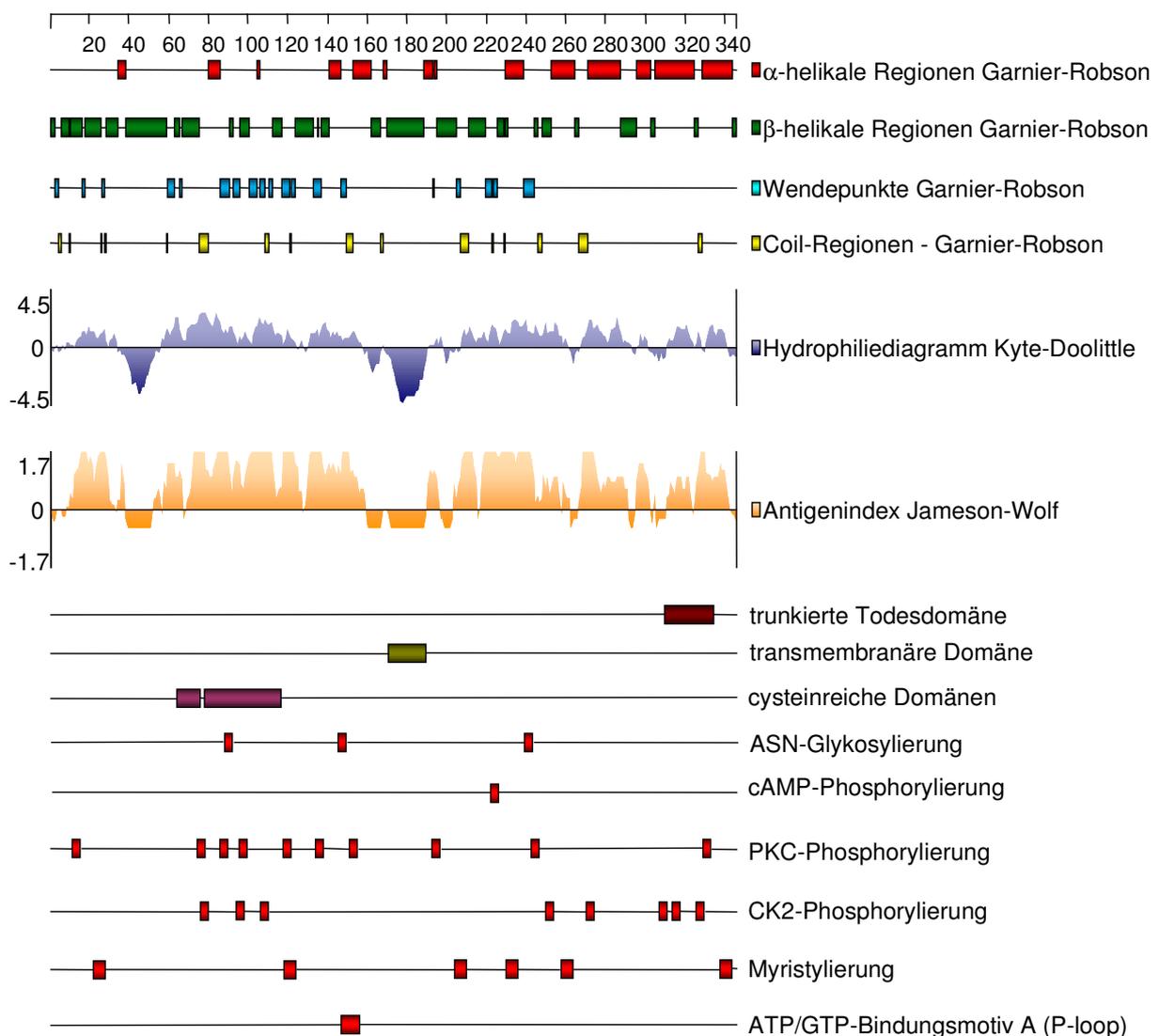


Abb. 3.12: Strukturelle Merkmale des TRAIL-R4- β -Proteins. Abgebildet sind die Ergebnisse der Computeranalysen zur Proteinstruktur mit Hilfe der Programme DNASTAR (Protean) und PROSITE.

Mit Hilfe der PSORT II-Software, die aus der Aminosäurezusammensetzung und Sekundärstruktur durch Anwendung des K-nearest neighbour (k-NN)-Algorithmus (HORTON et al. 1997) eine Vorhersage erlaubt, ergab sich für beide TRAIL-R4-Isoformen eine vorwiegende Assoziation zur Plasmamembran (**Tab. 3.7**).

Vorhergesagte Lokalisation	TRAIL-R4-α	TRAIL-R4-β
	%	%
Plasmamembran	34.8	26.1
nukleär	17.4	17.4
endoplasmatisches Retikulum	17.4	17.4
extrazellulär, incl. Zellwall	8.7	8.7
mitochondrial	4.3	8.7
Zytoskelett	4.3	4.3
Golgi-Apparat	–	4.3
peroxisomal	4.3	4.3
zytoplasmatisch	4.3	4.3
Vesikel des sekretorischen Systems	4.3	4.3

Tabelle 3.7: Ergebnisse der PSORT II-Analyse.

III.2. Zytostatika und Zytokine im Nierenzellkarzinom

III.2.1 Einfluß von Topotecan und rhTRAIL auf RCC-Zelllinien

Grundlage der folgenden Untersuchungen war die Beobachtung, daß die Kombination von löslichem rhTRAIL mit DNA-schädigenden Chemotherapeutika wie 5-Fluoruracil, Doxorubicin, Camptothecin die TRAIL-Zytotoxizität in Kolon-, Mamma- und Harnblasenkarzinomen *in vitro* und *in vivo* steigert.

Wir haben deshalb den Effekt von Topotecan, einem DNA-Topoisomerase I-Inhibitor, und dessen Kombination mit rhTRAIL untersucht. Dazu wurden jeweils eine TRAIL-sensitive und eine TRAIL-resistente RCC-Zelllinie ausgewählt (DEJOSEZ et al. 2000). Beide Zelllinien wurden für 24 Stunden mit 1 µg/ml Topotecan und zur Untersuchung eines möglichen synergistischen Effekts zusätzlich in einem zweiten Ansatz mit 10 ng/ml rhTRAIL inkubiert. Alle Untersuchungen wurden in dreifachen Ansätzen durchgeführt und die entsprechenden Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt. Die Lebendzellzahl wurde in einer NEUBAUER-Zählkammer ausgezählt (wie unter II.2.2 beschrieben) und als Quotient zwischen der Zellzahl der behandelten Gruppe und der nicht-behandelten Kontrollgruppe dargestellt.

Wie in **Abbildung 3.14** ersichtlich, führte die 24-stündige Inkubation mit löslichem rhTRAIL in der RCC-Zelllinie clearCa-6 zu einer Reduktion der Lebendzellzahl auf 45 %, während in der RCC-Zelllinie Chromphi-3 eine Abnahme der Lebendzellzahl von lediglich 7 % zu beobachten war. Die Behandlung mit Topotecan (1 µg/ml) führte in beiden Zelllinien zum Überleben von nahezu 50 % der Zellen (clearCa-6: 49 %; Chromphi-3: 47 %). Während die Co-Inkubation von rhTRAIL und Topotecan in der Zelllinie clearCa-6 lediglich zu einem additiven Effekt auf die Lebendzellzahl führte (2 % lebende Zellen), zeigte sich in der RCC-Zelllinie Chromphi-3 hingegen ein deutlicher Synergismus. Hier führt die kombinierte TRAIL/Topotecan-Behandlung zu einer Reduktion der Zellzahl um 94 %.

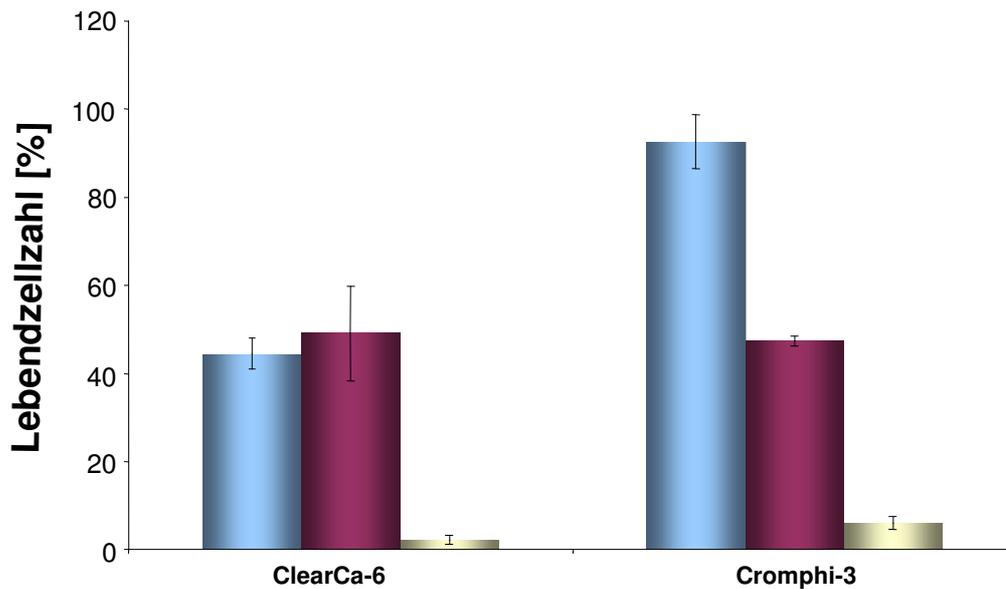


Abb.3.14: Topotecan- und rhTRAIL-Reaktivität in RCC-Zelllinien : Die Zellen wurden 24 h mit löslichem rhTRAIL (10 ng/ml) ■, Topotecan (1 µg/ml) ■ und in Kombination ■ inkubiert. Die Lebendzellzahl wurde durch Zählung in einer NEUBAUER-Zählkammer bestimmt.

III.2.2 Einfluß von Topotecan und rhTRAIL auf die mRNA-Expression der IAP-Mitglieder, DAP, DAP-Kinase und Cdk2 in RCC-Zelllinien

Mit den folgenden Experimenten wurde die Expression der Mitglieder der IAP-Familie, XIAP, Survivin, NAIP, IAP-1 und IAP-2, sowie der zellzyklusabhängigen Kinase Cdk2 und der proapoptischen DAP-Kinase und DAP nach Inkubation mit rhTRAIL (10 ng/ml), Topotecan (1 µg/ml), IFN-γ (100 U/ml) und CAPE (25 µg/ml) überprüft. Zusätzlich wurde der Einfluß der kombinierten Behandlung von rhTRAIL mit Topotecan, IFN-γ oder CAPE auf den mRNA-Status dieser Gene untersucht. Dazu wurden die primär TRAIL-sensible RCC-Zelllinie clearCa-6 und die TRAIL-resistente Zelllinie chromphi-3 mit den genannten Substanzen für 2, 6 und 12 h inkubiert und 25 µg der isolierten RNA in einer RPA-Analyse eingesetzt. Der 0 h-Wert wurde als Kontrolle der Grundexpression der analysierten Transkripte mitgeführt.

In **Abbildung 3.17** ist das Autoradiogramm der beiden untersuchten RCC-Zelllinien nach Inkubation mit 10 ng/ml rhTRAIL abgebildet.

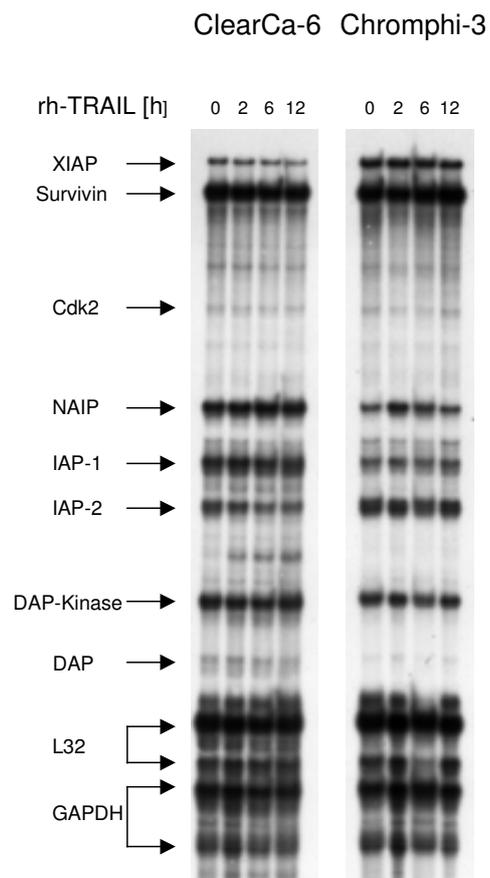


Abb. 3.17: RPA nach Inkubation von clearCa-6 und chromphi-3 rhTRAIL-Behandlung

Die Auswertung der Signalstärken erfolgte densitometrisch, wobei GAPDH als externer Standard zur Normierung der Meßdaten herangezogen wurde. So ergaben sich für die untersuchten Gene die in **Abbildung 3.18** graphisch dargestellten relativen Expressionsänderungen über die untersuchte Zeitspanne.

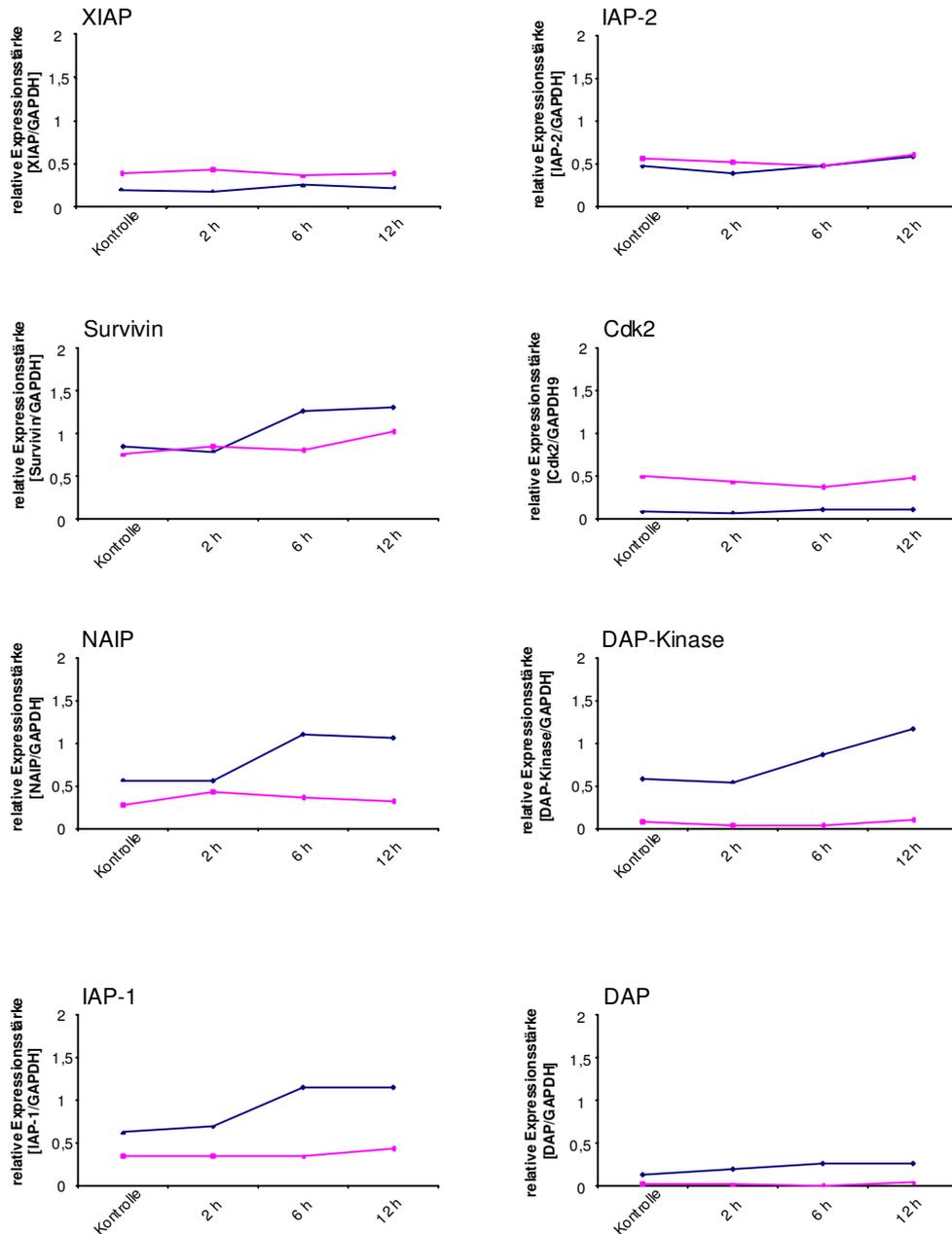


Abb.3.18: Densitometrische Auswertung der Expression der IAP-Mitglieder, DAP-kinase, DAP und Cdk2 0 h, 2 h, 6 h und 12 h nach Inkubation mit rhTRAIL. Die RCC-Zelllinien clearCa-6 —●— und chromphi-3 —◆— wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 10 ng/ml rhTRAIL inkubiert. Die Autoradiogramme wurden densitometrisch und die Expression der untersuchten Gene unter Berücksichtigung der GAPDH-Expression ausgewertet.

Während für XIAP, IAP-2, Cdk2 und DAP sowohl in der Zelllinie clearCa-6 als auch in chromphi-3 densitometrisch keine deutliche Änderung des Expressionsniveaus nachweisbar war, fand sich für Survivin, IAP-1, NAIP und DAP-Kinase ein differentieller zellinienspezifischer Verlauf der Signalstärken zu den jeweiligen Zeitpunkten. So zeigte Survivin in clearCa-6 einen tendenziell stärkeren Anstieg der Transkriptmenge nach 6 Stunden Inkubation mit rhTRAIL als in chromphi-3. Eine vergleichbare Induktion läßt sich für die IAP-1 und NAIP nachweisen. Hier steigt das Expressionsniveau in der klarzelligen Nierenkarzinom-Zelllinie ebenfalls nach 6 Stunden um das 2fache des Ausgangswertes an, während sich keine Steigerung der Signalstärke in der untersuchten chromophilzelligen Linie ergibt. Interessanterweise kommt es nach 2-stündiger Behandlung mit rhTRAIL in der TRAIL-sensiblen Zelllinie clearCa-6 über die festgelegten Zeitpunkte hinweg zu einer stetigen Expressionssteigerung der apoptoseinduzierenden DAP-Kinase, die in chromphi-3 vermisst wird.

In einer vergleichbaren Zeitkinetik wurde die Signalstärke dieser Transkripte nach isolierter Behandlung mit Topotecan (1 µg/ml) als auch in Kombination mit löslichem rhTRAIL (10 ng/ml) in beiden Zelllinien analysiert (**Abb.3.19**). Die densitometrisch ermittelte Expressionsänderungen der IAP-Mitglieder ist in **Abbildung 3.20** zusammengefaßt. Zur Anschaulichkeit wurde das bereits beschriebene Expressionmuster nach rhTRAIL-Gabe graphisch mit einbezogen. Hier zeigte sich sowohl bei isolierter Gabe von Topotecan als auch kombiniert mit rhTRAIL für XIAP in beiden untersuchten Zelllinien keine wesentliche Induktion des Transkriptionsniveaus. Ebenso zeigte die Inkubation mit diesen Substanzen in der chromophilzellig/papillären Zelllinie chromphi-3 keinen deutlichen Einfluß auf die Expression von Survivin, NAIP und IAP-1. Allenfalls läßt sich eine geringgradige Zunahme der Expression von NAIP nach der Kombinationsbehandlung vermuten. Auffällig erscheint vielmehr die Suppression einer Induktion von Survivin, NAIP und IAP-1 nach Zugabe von Topotecan in der Nierenkarzinomzelllinie clearCa-6. Diese Suppression wird durch die Kombination mit 10 ng/ml rhTRAIL jedoch teilweise aufgehoben, erreicht in diesem Fall jedoch nicht den densitometrisch ermittelten Kurvenverlauf wie bei alleiniger TRAIL-Behandlung. Die Zugabe von Topotecan, ebenso wie die rhTRAIL/Topotecan-Zugabe, induziert ein nahezu vergleichbares Expressionsmuster von IAP-2 in beiden RCC-Zelllinien. So führt Topotecan hier zu einer Reduktion der IAP-2-mRNA, die ebenso wie für

Survivin, IAP-1 und NAIP in clearCa-6 beobachtet, im Kombinationsversuch mit TRAIL teilweise aufgehoben wird.

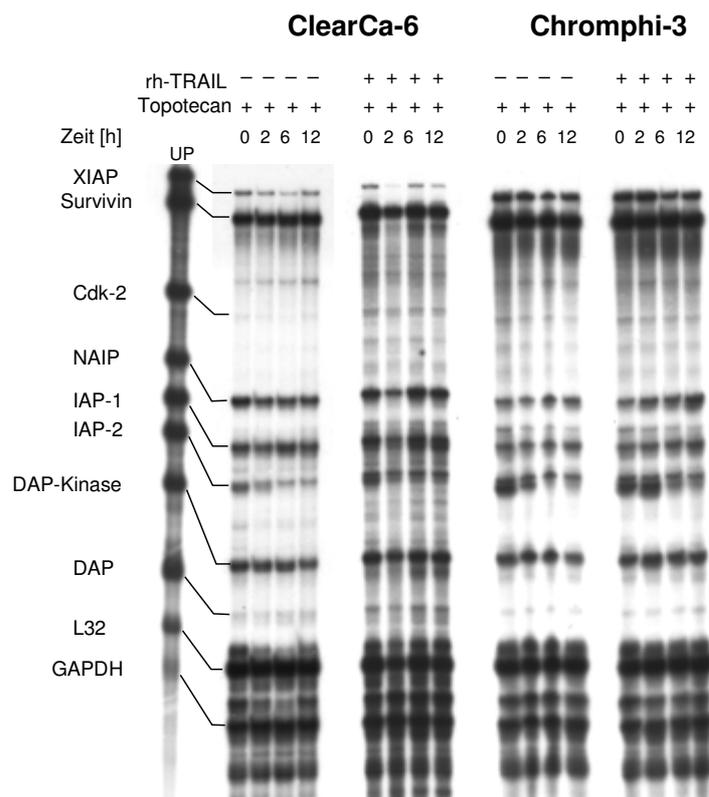
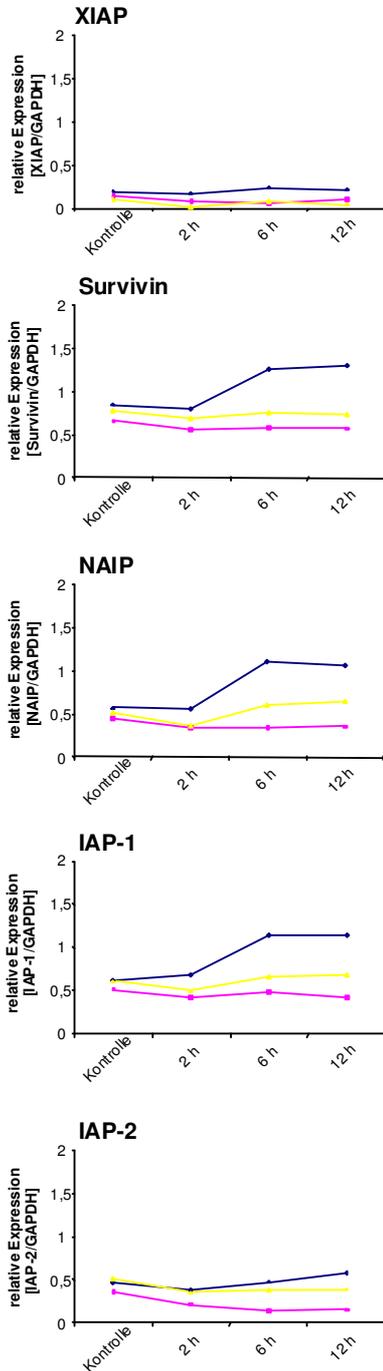


Abb. 3.19 : RPA nach Inkubation von clearCa-6 und chromphi-3 nach Topotecan und rhTRAIL

clearCa-6



chromphi-3

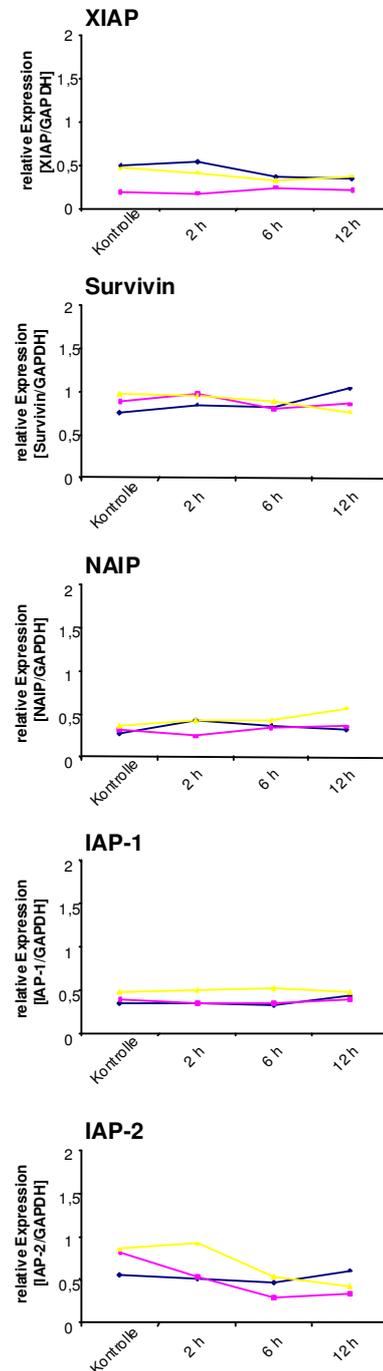


Abb.3.20: Densitometrische Auswertung der Expression der IAP-Mitglieder 0 h, 2 h, 6 h und 12 h nach Inkubation mit Topotecan und rhTRAIL: Die RCC-Zelllinien clearCa-6 und chromphi-3 wurden für die angegebenen Zeitpunkte isoliert mit 1 µg/ml Topotecan (◆) oder in Kombination mit 10 ng/ml rhTRAIL (◇) inkubiert. Zur Veranschaulichung ist das Expressionsniveau nach rhTRAIL-Behandlung (10 ng/ml) (●) zusätzlich abgebildet.

Wie aus der densitometrischen Auswertung (**Abb.3.21**) zu entnehmen ist, fand sich allerdings kein deutlicher Hinweis auf eine Induktion von CdK2, DAP-Kinase und DAP auf mRNA-Ebene nach Topotecan und/oder rhTRAIL-Behandlung.

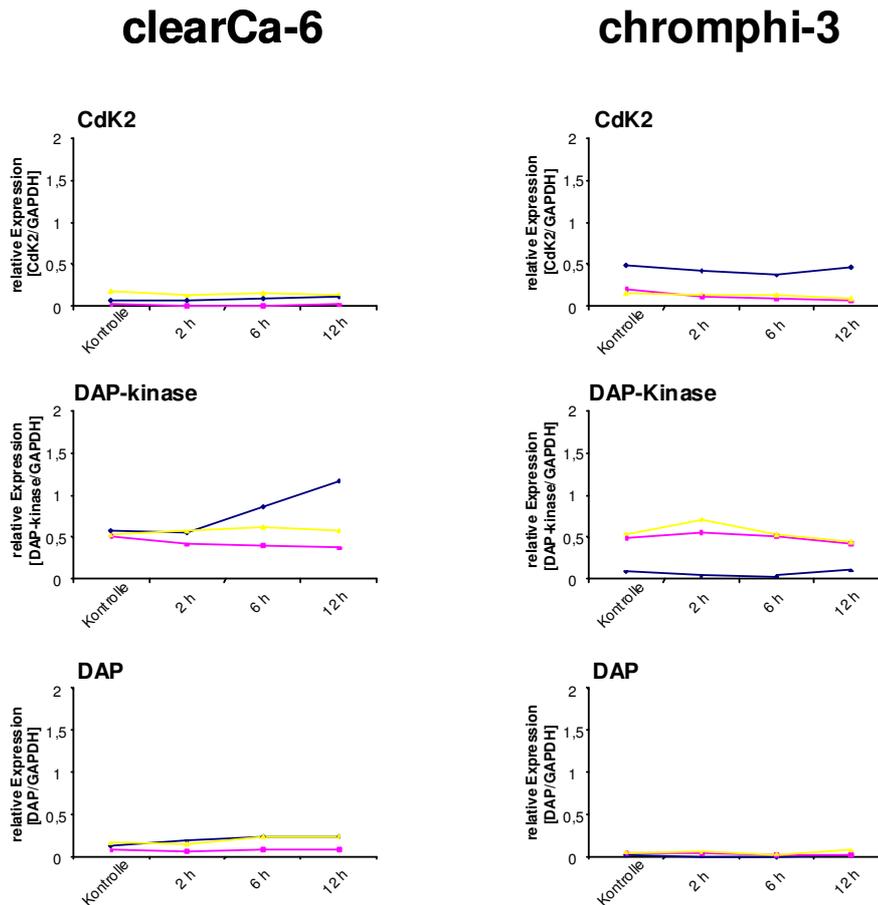


Abb.3. 21 : Densitometrische Auswertung der Expression von CdK2, DAP-Kinase und DAP 0 h, 2 h, 6 h und 12 h nach Inkubation mit Topotecan: Die RCC-Zelllinien clearCa-6 und chromphi-3 wurden für die angegebenen Zeitpunkte isoliert mit 1 µg/ml Topotecan ◆ oder in Kombination mit 10 ng/ml rhTRAIL ◆ inkubiert. Zur Veranschaulichung ist das Expressionsniveau nach rhTRAIL-Behandlung (10 ng/ml) ● zusätzlich abgebildet.

III.3 Die Rolle von Survivin im humanen malignen Tumoren

Die Expression von Survivin wurde bereits in zahlreichen humanen Neoplasien untersucht (LU et al. 1998, KAWASAKI et al. 1998, ADIDA et al. 1998, GROSSMANN et al. 1999, MONZO et al. 1999, SARELA et al. 2000, TANAKA et al. 2000, ISLAM et al. 2000, KATO et al. 2001). So zeigten Expressionsstudien an Biopsaten von Patienten mit Malignomen unterschiedlicher Entität, daß die zunehmende Survivin-Expression mit einer schlechteren Überlebensrate korreliert. Da bislang keine Untersuchung zur prognostischen Bedeutung der Survivin-Varianten Survivin- Δ Ex3 und Survivin-2B (MAHOTKA et al. 2000) in humanen malignen Tumoren vorliegen, wurde der Expressionstatus der Survivin-Isoformen im Nierenzellkarzinom und Magenkarzinom ermittelt und mit klinisch-pathologischen Variablen korreliert.

III.3.1 Die in vivo Expression von Survivin, Survivin- Δ Ex3 und Survivin-2B im humanen Nierenzellkarzinom

Da derzeit keine kommerziellen Antikörper gegen die Survivin-Varianten erhältlich sind, erfolgte die Ermittlung des Expressionsstatus von Survivin und seinen alternativen Spleißvarianten in Nierenkarzinomgewebeproben mit Hilfe der RT-PCR-Analyse (Tab. 3.3).

Variable	Anzahl der Patienten	Anzahl der Patienten und histologische Typen des Nierenzellkarzinoms		
		klarzelliger Typ	chromophiler/papillärer Typ	chromophober Typ
Tumorstadium des Primärtumors				
pT 1/pT2	45	36	7	2
pT3	12	12	0	0
histologischer Grad				
G1	2	2	0	0
G2	49	40	7	2
G3	6	6	0	0

Tabelle 3.3: Klinisch-pathologische Variablen der untersuchten primären Nierenzellkarzinome (n= 57). Die Gewebeproben stammen aus Nephrektomiepräparaten. Zusammengefaßt wurden die Tumorstadien pT1 und pT2, da sich diese lediglich in der Tumorgroße, jedoch nicht durch Invasion in perirenales Gewebe wie Tumoren des Stadiums pT3 auszeichnen.

Die Quantifizierung der Amplifikationsprodukte erfolgte danach densitometrisch, wobei GAPDH, ein „house-keeping“-Enzym als externer Standard herangezogen wurde. Es wurden Quotienten zwischen den einzelnen Survivin-Varianten auf der einen Seite und GAPDH auf der anderen Seite gebildet. Um zu vermeiden, daß die Amplifikation der Survivin-Varianten und von GAPDH den Sättigungsbereich einer enzymatischen Reaktion erreichte, wurde eine Standardkurve durch Zyklustitration generiert (**Abb. 3.22**).

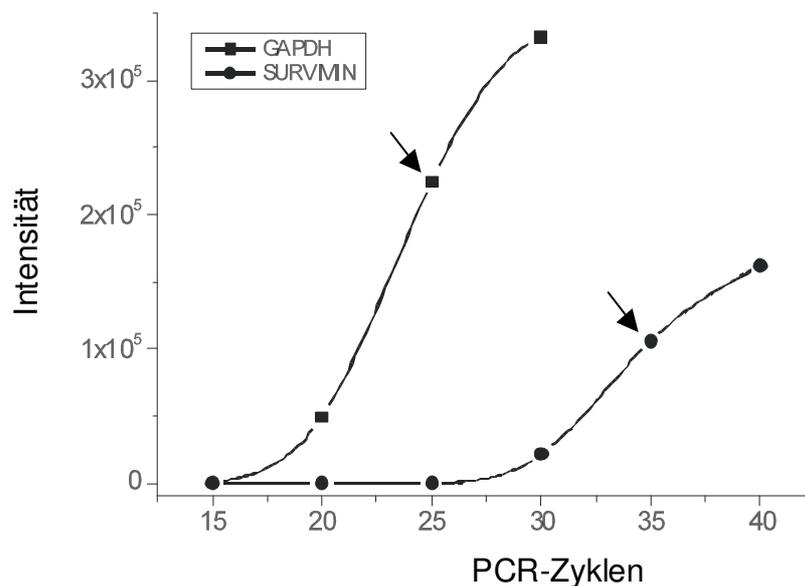


Abb. 3.22 : Zyklustitration der GAPDH- und Survivin-Amplifikation. Zur Zyklentitration der GAPDH-Amplifikation wurden 15, 20, 25, 30 und 35 Zyklen, für die der Survivin-Amplifikation zusätzlich 40 Zyklen durchlaufen. Die Pfeile zeigen den gewählten Zyklusbereich für die untersuchten Gewebeproben an.

Demnach erfolgte die Survivin-Amplifikation bei 35 Zyklen und die GAPDH-Amplifikation bei 25 Zyklen.

Eine mRNA-Expression von Survivin, Survivin- Δ Ex3 und Survivin-2B konnte in allen untersuchten Nierenzellkarzinomen ($n = 57$) unabhängig von ihrem histologischen Typ, Differenzierungsgrad (Grading) und Tumorstadium (Staging) nachgewiesen werden (**Abb.3.23**)

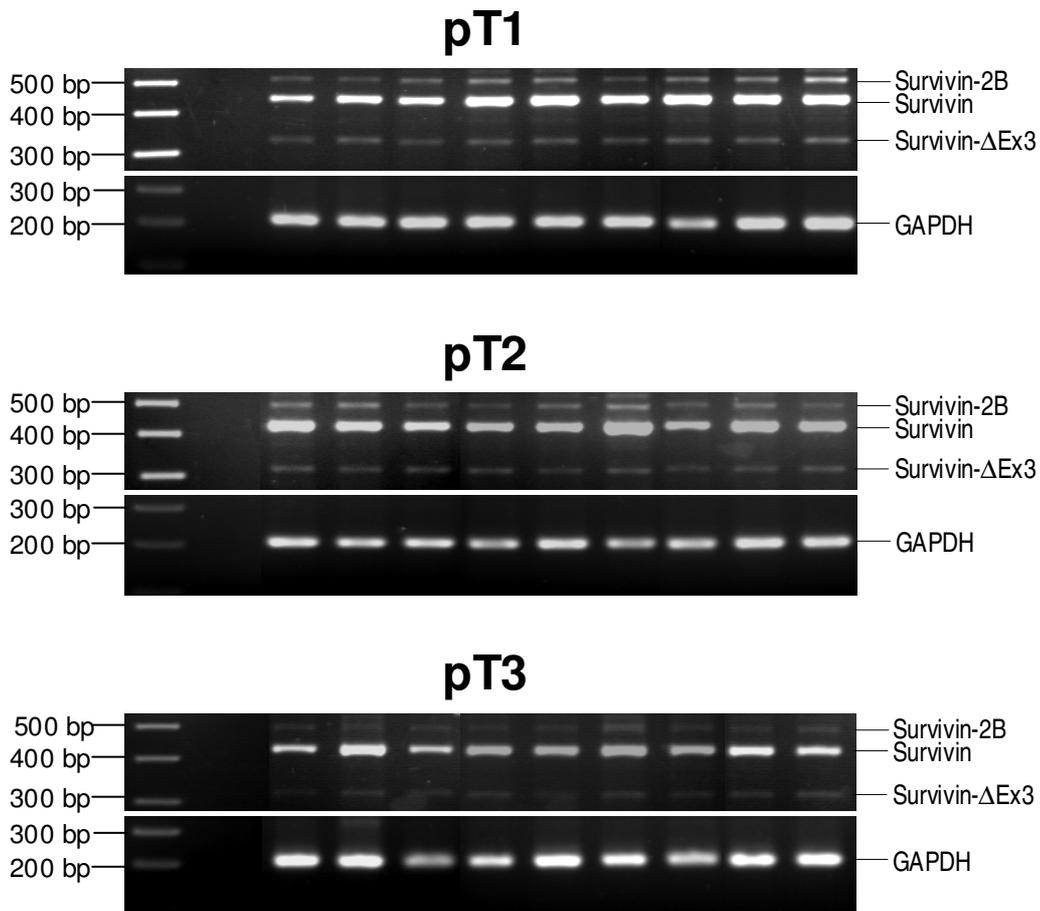


Abb. 3.23 : Amplifikation von Survivin und seinen alternativen Spleißvarianten im Nierenzellkarzinom. 2 µg RNA wurden revers transkribiert und mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung visualisiert. Dargestellt ist eine exemplarische Auswahl von Proben der einzelnen Tumorstadien. Survivin (431 bp); Survivin-2B (500 bp); Survivin-ΔEx3 (329 bp).

Aufgrund der geringen Fallzahl ($n = 2$) wurden die Nierenzellkarzinome vom chromophoben Typ von der statistischen Auswertung mit Hilfe des Wilcoxon- und Mann-Whitney-Test für nicht-parametrische Daten ausgeschlossen.

Die Survivin-mRNA stellte im Gegensatz zu den beiden Spleißvarianten Survivin-ΔEx3 und Survivin-2B statistisch signifikant das dominierende Transkript dar ($p < 0,001$) (**Abb.3.24**).

Beim Vergleich der Expressionsstärke beider alternativen Spleißvarianten untereinander

wurde das nicht-antiapoptotische Survivin-2B stärker exprimiert ($p < 0,001$) (**Abb.3.24**). Diese statistischen Verteilungen ergaben sich auch beim Vergleich der Survivin-Varianten in den einzelnen Tumortypen vom klarzelligen und chromophilen/papillären Typ (**Abb.3.324**).

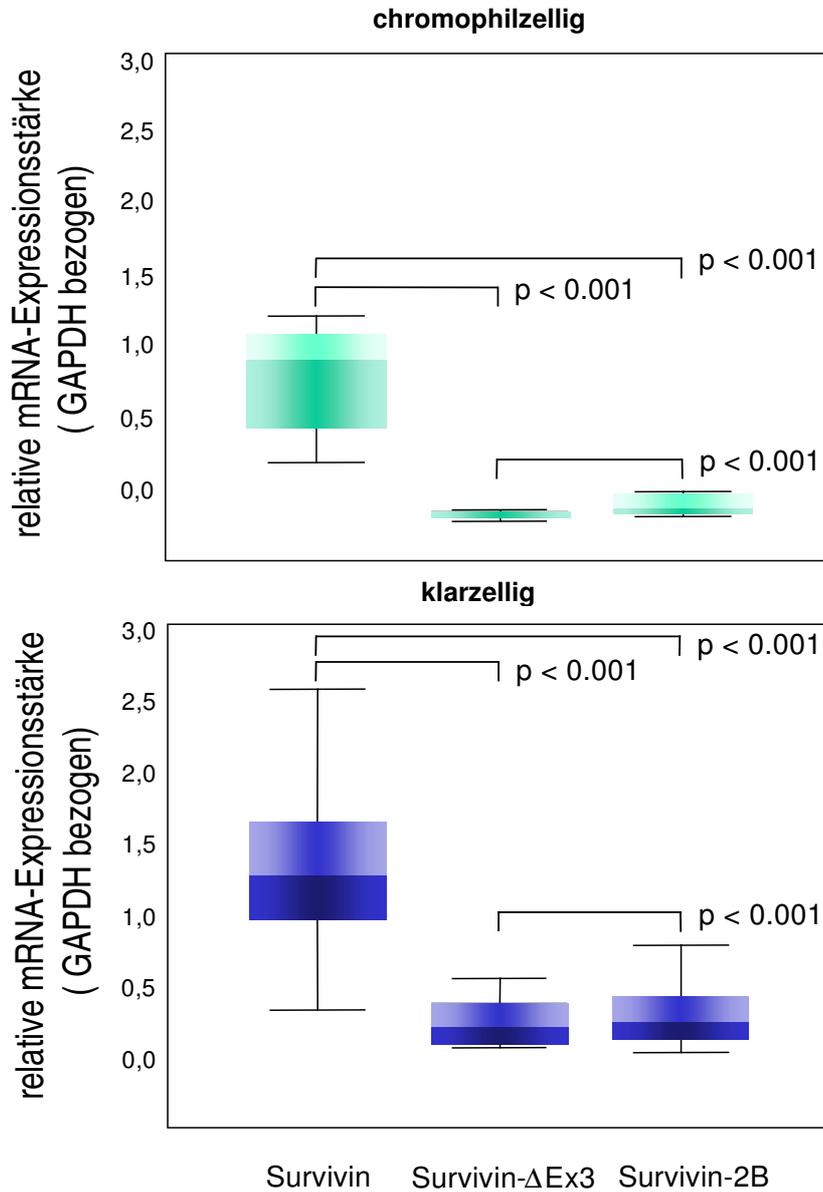


Abb. 3.24: Relative Verteilung der Survivinvarianten in klarzelligen und chromophilzelligen Nierenzellkarzinomen *in vivo*

III.3.1.1 Verteilung der Survivin-Varianten in Abhängigkeit vom histologischen Tumortyp

Chromophile Nierenzellkarzinome wiesen einen signifikant (Survivin: $p = 0,01$; Survivin- Δ Ex3: $p < 0,001$; Survivin-2B: $p = 0,003$) geringeren Expressionsstatus aller Survivin-Varianten im Vergleich zu Tumoren vom klarzelligen Typ gleichen Tumorstadiums auf (Abb3.25).

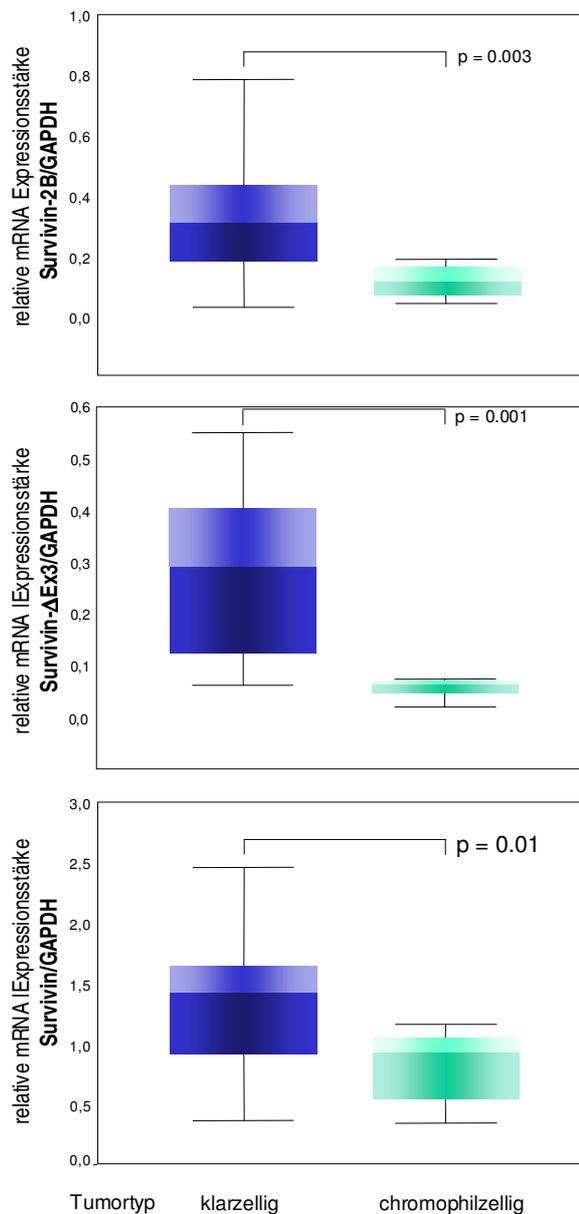


Abb. 3.25: Tumortypenspezifische Expression der Survivinvarianten im Nierenzellkarzinom

Um weitere Unterschiede zwischen Nierenzellkarzinomen vom klarzelligen und chromophilzelligen Typ zu definieren, wurde ein Quotient aus der mRNA-Expression zwischen den antiapoptotischen Survivinvarianten (Survivin und Survivin- Δ Ex3) und dem nicht-antiapoptotischen Survivin-2B errechnet. Dadurch kann möglicherweise die Nettobilanz der funktionellen Effekte der unterschiedlichen Survivin-Varianten in den verschiedenen histologischen Typen abgeschätzt werden. Tatsächlich ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,012$) beim Vergleich der Nettobilanzen zwischen klarzelligen und chromophilen Nierenzellkarzinomen, wobei die antiapoptotischen Survivin-Varianten in beiden Nierenkarzinomtypen überwiegen (**Abb.3.26**).

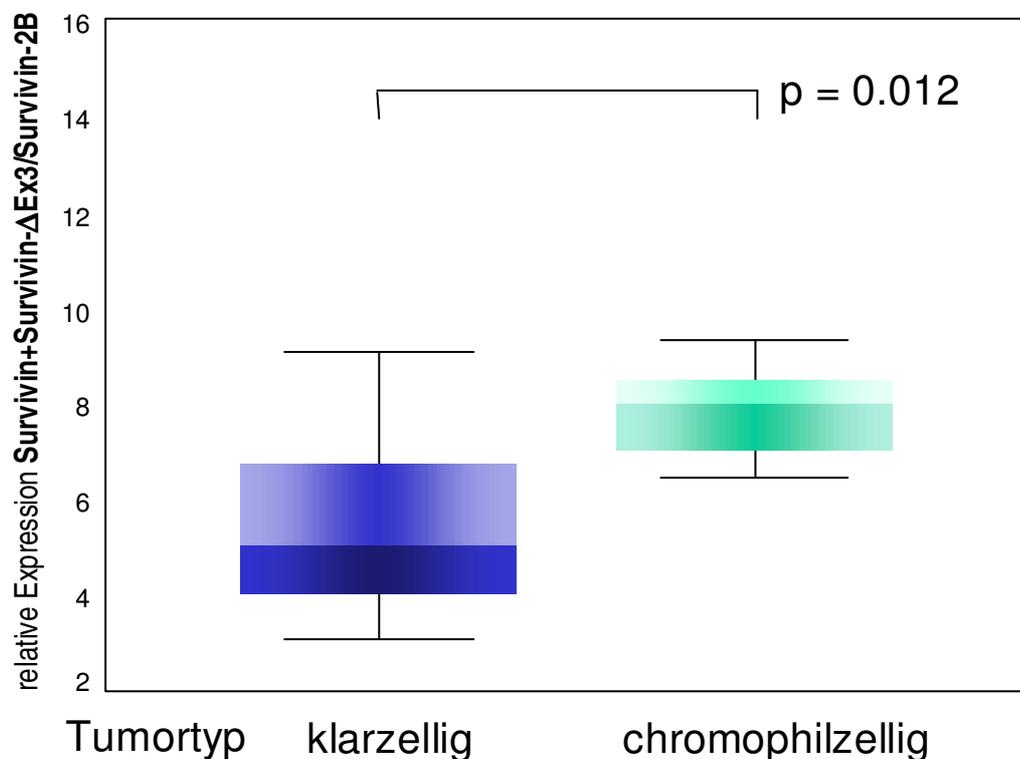


Abb. 3.26: Relative Expression der antiapoptotischen Survivinvarianten gegenüber der nicht-antiapoptotischen Survivinvariante Survivin-2B innerhalb der Tumortypen

III.3.1.2 Verteilung der Survivin-Varianten in Abhängigkeit vom Tumorstadium (pTNM)

Weiterhin wurde untersucht, ob eine tumorstadienabhängige Verteilung der Survivin-Varianten in Nierenzellkarzinomen definierbar war. Da uns keine chromophilen Nierenzellkarzinome der Kategorie T3 zur Verfügung standen (**Tab. 3.3**), konnten lediglich die Tumorproben vom klarzelligen Typ in diese Auswertung eingehen.

Für klarzellige Nierenzellkarzinome konnte eine statistisch signifikante, stadienabhängige Reduktion in der Expressionsstärke von Survivin- Δ Ex3 ($p = 0,005$) und -2B ($p = 0,007$) nachgewiesen werden, wenn die Tumorstadien pT1 und pT2, die sich lediglich in der Tumorgröße (pT1 < 7 cm; pT2 > 7 cm) unterscheiden, den Karzinomen des Stadiums pT3, die im Gegensatz zu den Stadien pT1 und pT2 das perirenale Gewebe bereits infiltrieren, gegenübergestellt werden (**Abb.3.27**). Dagegen konnte diese abnehmende Expressionstärke mit zunehmender T-Kategorie für die klassische Survivin-Variante nicht nachgewiesen werden, vielmehr persistierte die Expressionsstärke auf hohem Status (**Abb.3.27**).

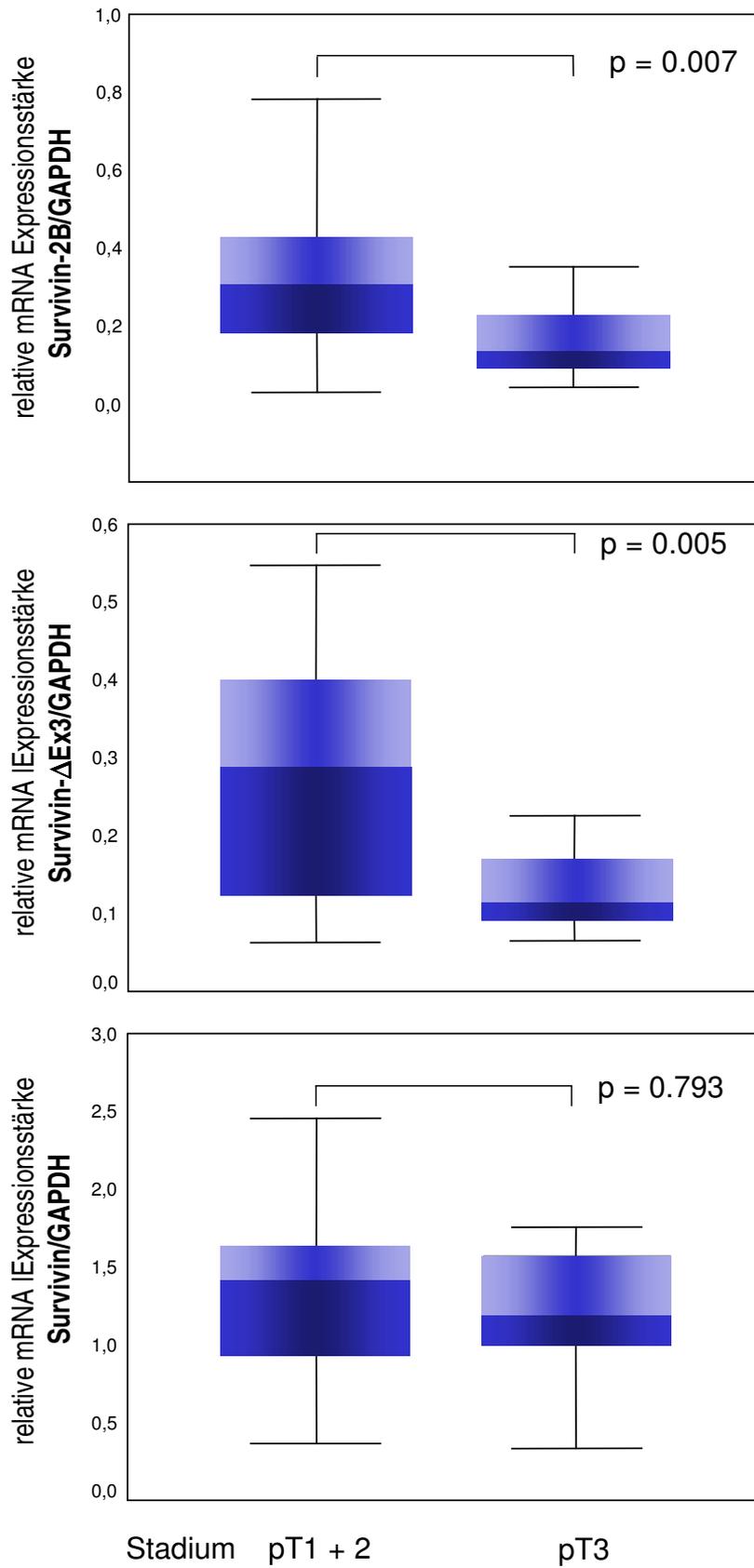


Abb. 3.27: Stadienabhängige Expression der Survivinvarianten in klarzelligen Nierenzellkarzinomen

Um nun eine stadienabhängige Schwankung der GAPDH-Expression als Ursache dieses Ergebnisses auszuschließen, wurden zusätzlich Survivin als interner Standard herangezogen und erneut die entsprechenden Quotienten berechnet. Dadurch wurde wiederum die stadienabhängige, signifikante Abnahme der Amplifikationsprodukte von Survivin- Δ Ex3 ($p = 0,005$) und Survivin-2B ($p < 0,001$) bestätigt (**Abb. 3.28**).

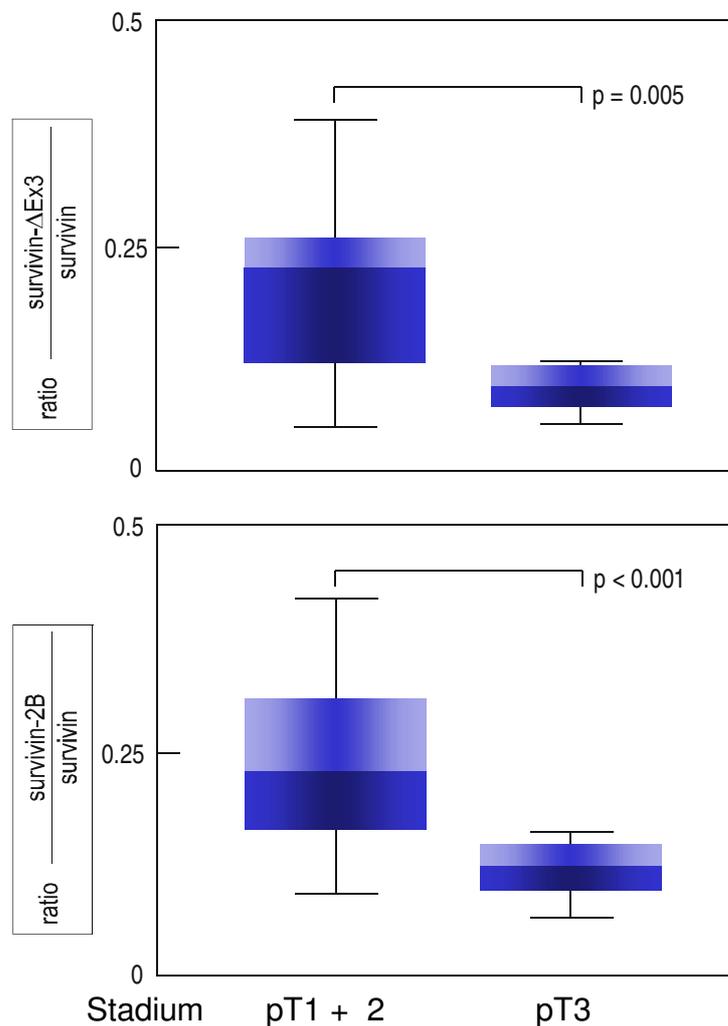


Abb. 3.28: Stadienabhängige Expression von Survivin- Δ Ex3 und -2B im Nierenzellkarzinom: Survivin diente als interner Standard (kompetitive PCR).

Erneut wurde, wie bereits beschrieben (Kap. 2.1.2), ein Index durch Bildung eines Quotienten zwischen den antiapoptotischen Varianten und dem nicht-antiapoptotischen Survivin-2B ermittelt. Dieser Index zeigte in fortgeschrittenen pT3-Tumorstadien eine signifikante ($p < 0,001$) Zunahme und damit eine Dominanz der antiapoptotischen Survivin-Varianten in fortgeschrittenen Stadien des klarzelligen Nierenzellkarzinoms (**Abb.3.29**).

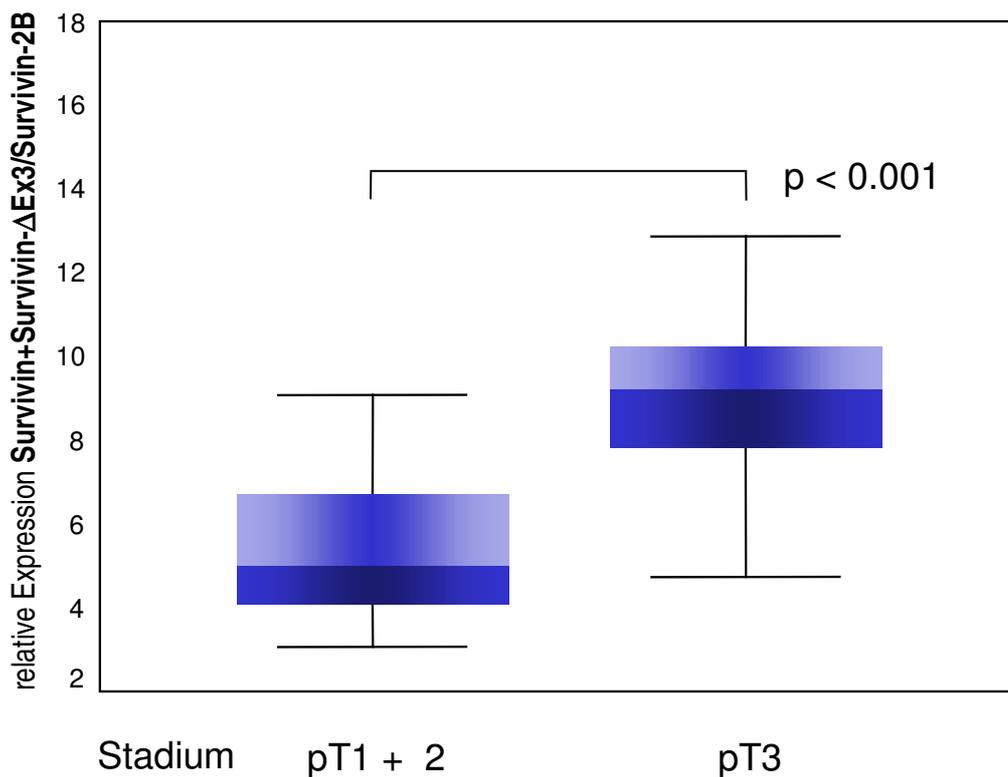


Abb 3.29: Relative Expression der antiapoptotischen Survivinvarianten gegenüber der nicht-antiapoptotischen Survivinvariante Survivin-2B in stadienabhängiger Form

III.3.2 Die *in vivo* Expression von Survivin, Survivin- Δ Ex3 und Survivin-2B im humanen Magenkarzinom

Analog zu den RT-PCR-Untersuchungen zur *in vivo*-Expression von Survivin und den alternativen Spleißvarianten Survivin- Δ Ex3 und -2B im Nierenzellkarzinom wurde unter vergleichbarem Versuchsaufbau die Expression der drei Survivin-Varianten im Magenkarzinom von 30 Patienten überprüft.

pTNM Stadium	Erkrankungsstadium		Anzahl der Patienten
pT1	N0M0	I A	1
	N1M0	I B	1
pT2	N0M0	I B	4
	N1M0	II	9
	N2M0	III A	4
	N3M0	IV	2
pT3	N1M0	III A	3
	N2M0	III B	1
	N3M1	IV	4
pT4	N1M0	IV	1

Tabelle 3.4: Klinisch-pathologische Variablen der untersuchten primären Magenkarzinome (n=30). Zusammengefaßt wurden die Tumorstadien I und II sowie die fortgeschritteneren Stadien III und IV nach der UICC-Klassifikation.

Ferner standen vierzehn Tumorproben und korrespondierende Proben aus Normalgewebe zur Verfügung.

Die Quantifizierung der Amplifikationsprodukte erfolgte densitometrisch, wobei wieder GAPDH als externer Standard herangezogen wurde. In Anlehnung an die Untersuchung zur *in vivo* Expression der Survivin-Varianten im Nierenzellkarzinom wurden ebenfalls in Titrationskurven für Survivin und GAPDH die Sättigungsphase der jeweiligen PCR-

Amplifikation bestimmt und für die Analyse der Survivin-Varianten im Magenkarzinom Zykluszahlen weit vor der Sättigungsphase benutzt (**Abb. 3.30**).

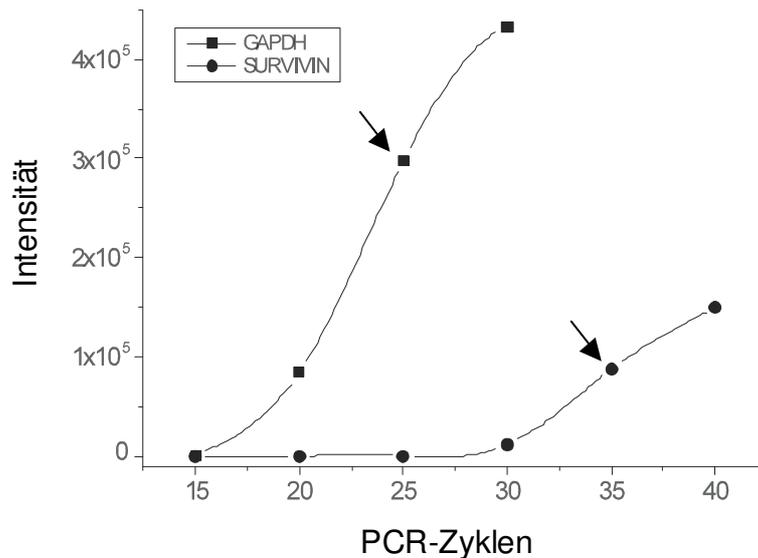


Abb. 3.30 : Zyklustitration der GAPDH- und Survivin-Amplifikation. Zur Zyklentitration der GAPDH-Amplifikation wurden 15, 20, 25, 30 und 35 Zyklen, für die der Survivin-Amplifikation zusätzlich 40 Zyklen durchlaufen. Die Pfeile zeigen den gewählten Zyklusbereich für die untersuchten Gewebeprobe an.

In acht von vierzehn nicht-neoplastischen Gewebeprobe konnte keine oder nur eine geringe Expression der Survivin mRNA beobachtet werden (**Abb. 3.31 A**). Dabei war das Expressionsniveau von Survivin in den Karzinomen signifikant ($p=0,005$) höher als in den korrespondierenden nicht-neoplastischen Geweben (**Abb. 3.31 B**). Während die Expression von Survivin- Δ Ex3 keinen signifikanten Unterschied zwischen nicht-neoplastischem und neoplastischem Gewebe aufwies ($p=0,059$), konnte eine signifikant erhöhte Expression von Survivin-2B in Magenkarzinomen beobachtet werden (**Abb. 3.31 B**).

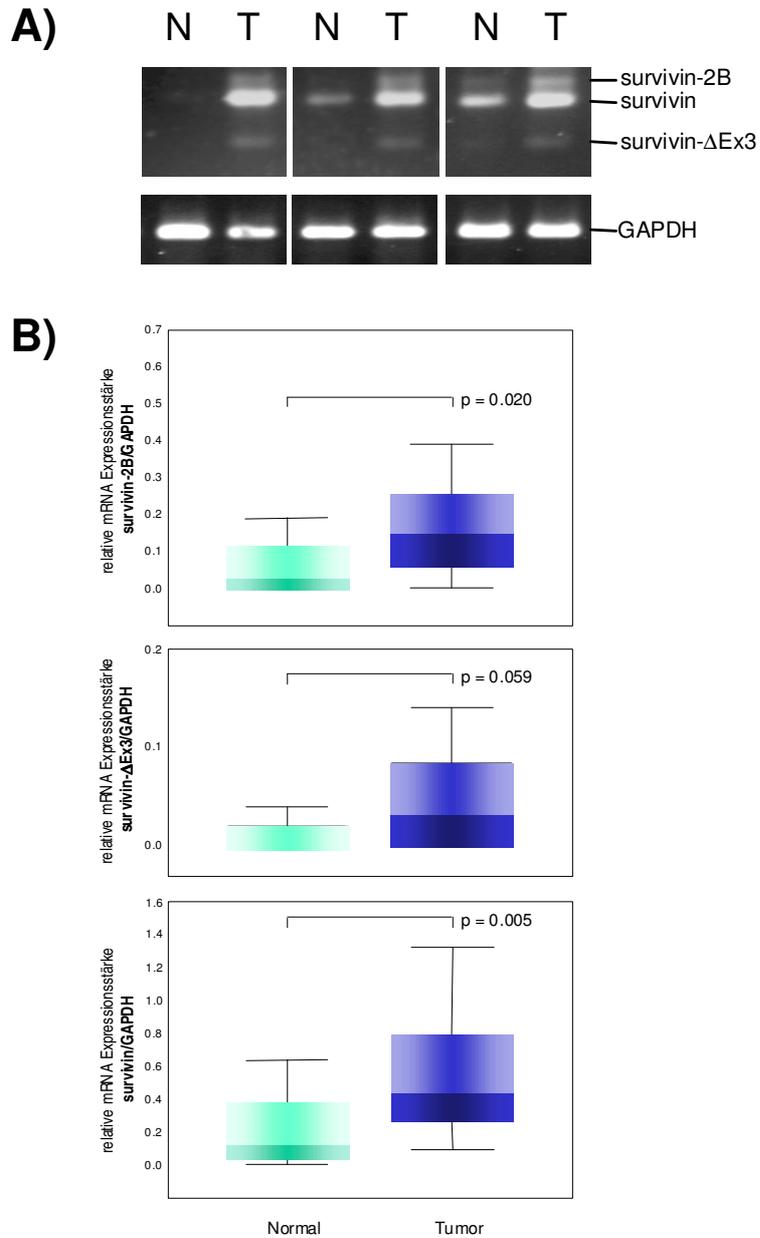


Abb. 3.31: RT-PCR-Amplifikation (A) und relative (GAPDH-standardisierte) mRNA Level (B) der Survivin-Varianten in korrespondierenden nicht-neoplastischem (N) und neoplastischem (T) Magengewebe. A) In acht von vierzehn nicht-neoplastischen Gewebeproben konnte keine oder nur eine geringe Expression von Survivin beobachtet werden. In allen Karzinomproben übertraf das Expressionsniveau von Survivin das der korrespondierenden nicht-neoplastischen Gewebe. GAPDH diente als Standard. **B)** Die Expression von Survivin und Survivin-2B, nicht aber die von Survivin-ΔEx3 ist in Magenkarzinomen erhöht. Der zweiseitige p-Wert wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests ermittelt

In die Tumoranalyse gingen 30 Magenkarzinome von Patienten nach Gastrektomie ein. Tumortyp, Differenzierungsgrad und Tumorstadium wurden nach den Richtlinien der WHO und UICC erfaßt. Weitere klinisch-pathologische Parameter wie Alter, Geschlecht lymphatische Invasion, Blutgefäßinvasion, *Helicobacter pylori*-Kolonisation und Dichte der chronisch inflammatorischen Infiltration in der dem Tumor benachbarten nichtneoplastischen gastralen Mukosa (in Anlehnung an die Sydney-Klassifikation) wurden für alle Patienten definiert. Die Patientenproben wurden mit freundlicher Unterstützung von Herrn Priv. Doz. Dr. W. Müller (Institut für Pathologie, HHU Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

Die Expression von Survivin und seinen alternativen Spleißvarianten Survivin- Δ Ex3 und -2B konnte zunächst einmal in allen Magenkarzinomen unabhängig von ihrem histologischen Typ, Differenzierungsgrad und Tumorstadium nachgewiesen werden. Auffällig ist jedoch, daß bereits in dieser Darstellung für beide alternativen Spleißvarianten unterschiedlich starke Signale erkennbar sind (**Abb 3.32**).

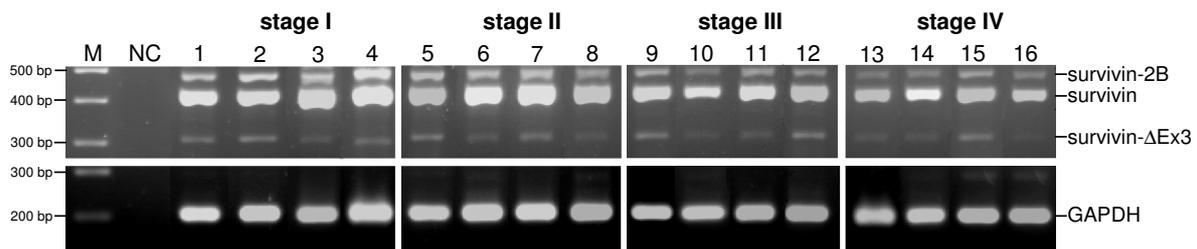


Abb. 3.32: Amplifikation von Survivin und seinen alternativen Spleißvarianten im Magenkarzinom. 2 μ g RNA wurden revers transkribiert und mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung visualisiert. Dargestellt ist eine exemplarische Auswahl von Proben der einzelnen Tumorstadien. Survivin (431 bp); Survivin-2B (500 bp); Survivin- Δ Ex3 (329 bp).

Wie man in der statistisch ermittelten Box-Blot-Darstellung zur densitometrischen Auswertung erkennen kann, erwies sich Survivin in allen Magenkarzinomen als das dominierende Amplifikationsprodukt, während Survivin- Δ Ex3 und -2B deutlich schwächere Signale erzeugten (**Abb. 3.33**).

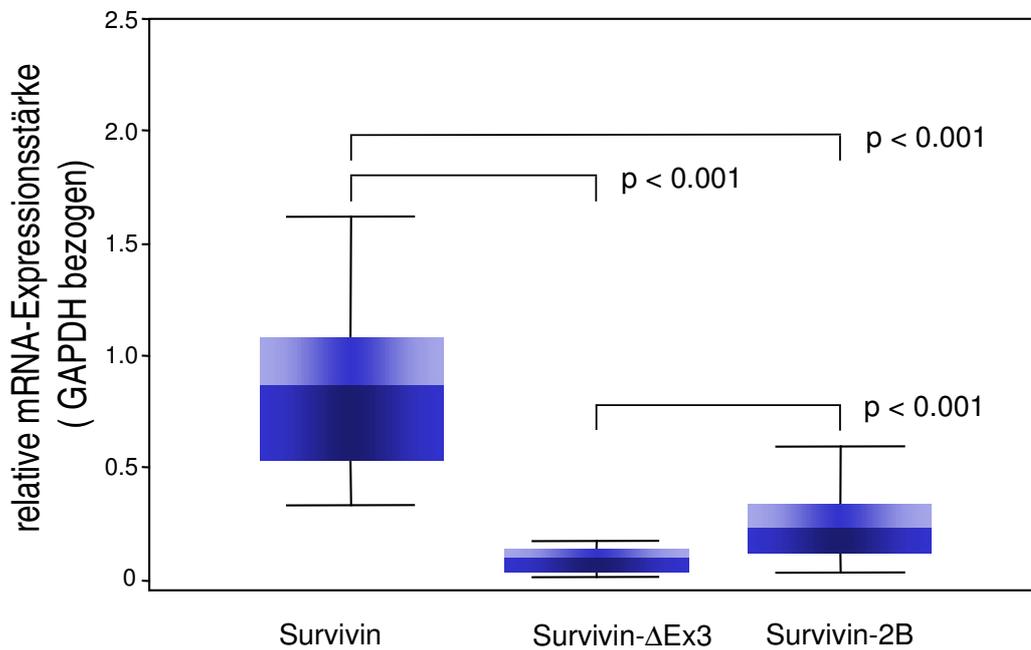


Abb. 3.33: Statistische Verteilung der Survivinvarianten im Magenkarzinom

Vor kurzem konnte gezeigt werden, daß die Survivin-Expression mit der Prognose von Patienten, die an malignen Tumoren erkrankten, korreliert. Aus diesem Grund wurde die stadienabhängige Expression der drei Survivin-Spleißvarianten vergleichend in niedrigeren Tumorstadien (Stadium I + II nach UICC) und fortgeschrittenen Tumorstadien (Stadium III + IV nach UICC) überprüft. Wie man in **Abbildung. 3.34** erkennt, veränderte sich die Expressionsstärke der antiapoptotischen Varianten Survivin und Survivin-ΔEx3 zwischen niedrigen und fortgeschrittenen Tumorstadien nicht signifikant.

Im Gegensatz dazu fand sich eine statistisch signifikante ($p = 0,033$) Abnahme in der Expression der nicht-antiapoptotischen Survivin-2B-Variante in fortgeschrittenen Tumorstadien (**Abb.3.34**)

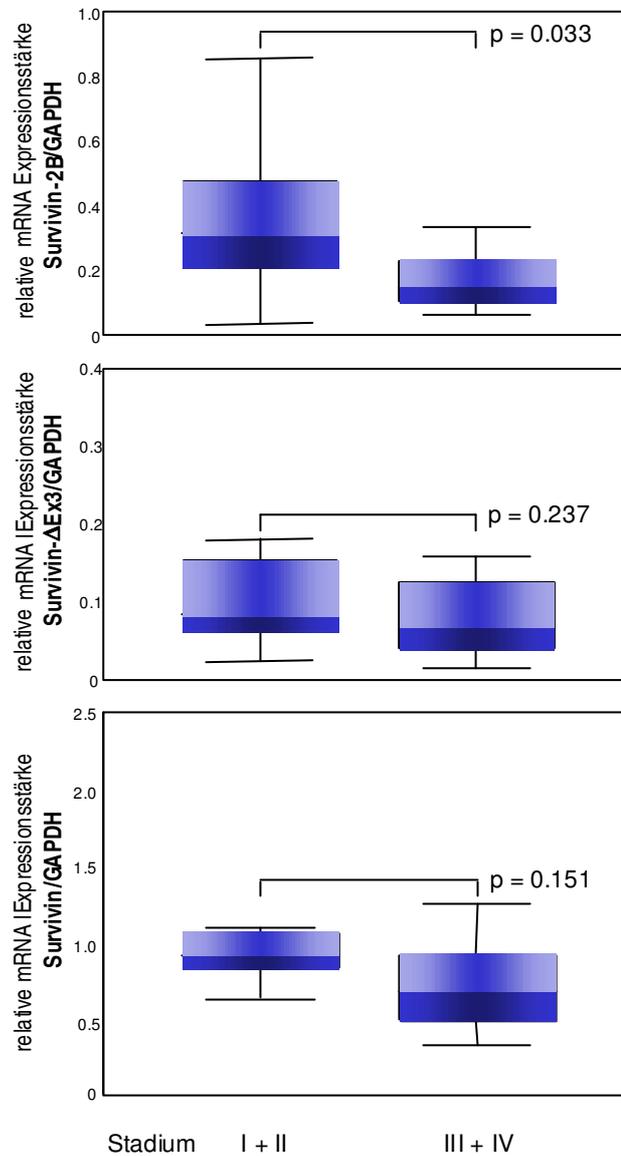


Abb. 3.34: Stadienabhängige Expression der Survivinvarianten im Magenkarzinom

Um stadienabhängige Schwankungen der GAPDH-Expression, die zur Normierung der Survivin-Meßwerte herangezogen wurde, als mögliche Ursache dieses Befundes auszuschließen, wurden die Quotienten der RNA-Level zwischen Survivin- Δ Ex3 oder Survivin-2B auf einer Seite und Survivin als internen Standard auf der anderen Seite zusätzlich berechnet. Da alle Survivin-Varianten aus einem gemeinsamen Pool von hnRNA-Präkusoren stammen, sind diese Quotienten unabhängig von einem untersuchungsabhängigen Störfaktor, der durch eine mögliche Schwankung in der GAPDH-Expression verursacht werden könnte. Hierbei bestätigte sich erneut die signifikante, stadienabhängige Abnahme der Amplifikationsprodukte von Survivin-2B, nicht jedoch von Survivin- Δ Ex3 (**Abb. 3.35**).

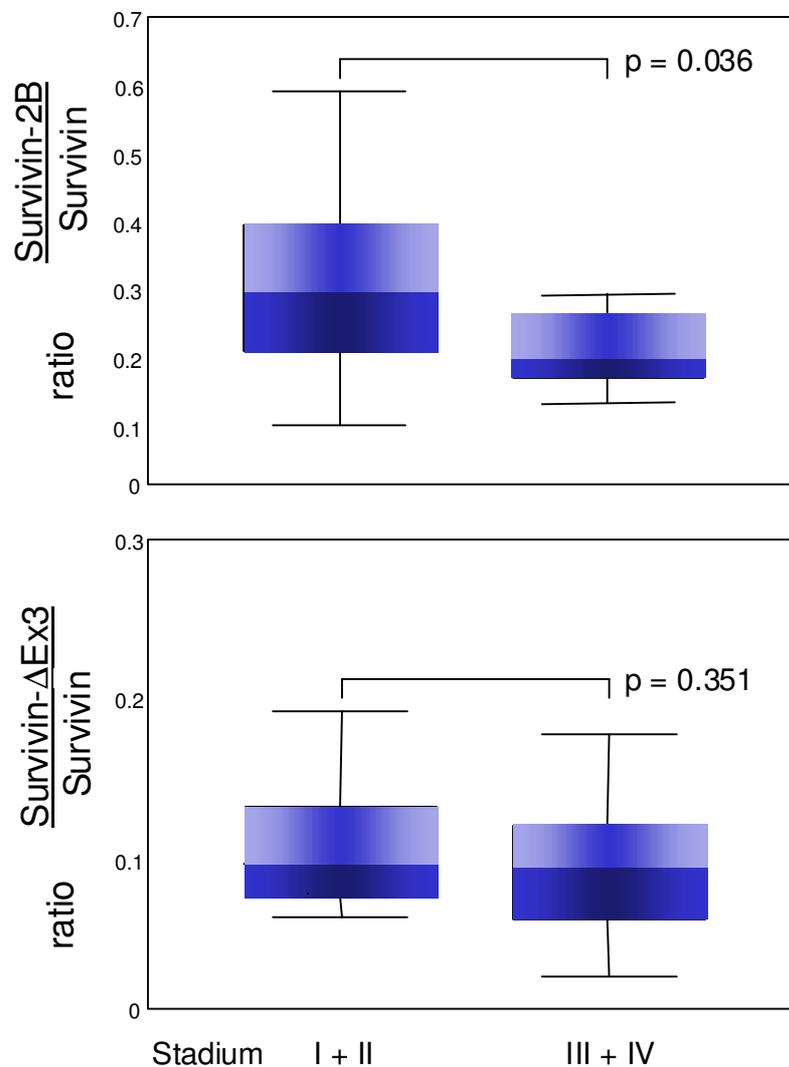


Abb. 3.35: Stadienabhängige Expression von Survivin- Δ Ex3 und -2B im Magenkarzinom: Survivin diente als interner Standard

In einem weiteren Schritt wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests, der bereits für die statistische Überprüfung einer Stadienabhängigkeit in der Expression von Survivin-Varianten eingesetzt wurde, der Einfluß von weiteren klinisch-pathologischen Variablen auf die Survivin-Expression überprüft. Mit Ausnahme der bereits beschriebenen stadienabhängigen Abnahme der Survivin-2B-Expression, ergab sich für keine der untersuchten klinisch-pathologischen Variablen eine statistisch signifikante Korrelation zur Signalstärke von Survivin und seinen beiden alternativen Spleißvarianten (**Tab. 3.5**).

Variable	Anzahl der Patienten	p-Wert		
		Survivin	Survivin-ΔEx3	Survivin-2B
Stadium (UICC)*				
I + II	15	0.152	0.237	0.033
III + IV	15			
Differenzierungsgrad				
G1** + G2	9	0.428	0.982	0.067
G3 + G4**	21			
Histologischer Typ				
Intestinal	16	0.645	0.272	0.231
Diffus	11			
Gemischt	***			
Lymphatische Gefäßinvasion				
Positiv	20	0.860	0.509	0.895
Negativ	10			
Blutgefäßinvasion				
Positiv	8	0.399	0.223	0.281
Negativ	22			
Helicobacter pylori Infektion				
Positiv	14	0.561	0.739	0.430
Negativ	16			
Chronische Inflammation				
Vorhanden	19	0.098	0.237	0.333
Abwesend	11			
Alter				
≤ 65 Jahre	16	0.183	0.135	0.135
> 65 Jahre	14			
Geschlecht				
Weiblich	10	0.428	0.895	0.598
Männlich	20			

* Infiltrationstiefe: pT1 : n = 2; pT2 : n = 19; pT3 : n = 8; pT4 : n = 1. Lymphknotenbeteiligung:

pN0 : n = 5; pN1 : n = 14; pN2 : n = 5; pN3 : n = 6. Fernmetastasen: M0 : n = 25; M1 : n = 5.

** nur ein Fall

*** nicht in die statistische Auswertung einbezogen aufgrund der geringen Fallzahl

Tab. 3.5: Ergebnis der statistischen Auswertung verschiedener klinisch-pathologischer Variablen in Bezug auf die Expression der Survivin-Isoformen im Magenkarzinom

III.4 Die mRNA-Expression von Survivin, Survivin- Δ Ex3 und Survivin-2B im humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Da Survivin neben seiner antiapoptotischen Wirkung auch eine Bedeutung im Rahmen der Proliferation und Differenzierung zukommen könnte, wurde die Expression von Survivin und seinen Spleißvarianten in ruhenden und Mitogen-aktivierten PBMCs von vier gesunden Spendern als Modellsystem mittels RT-PCR und der RPA-Analyse untersucht. In diesem Zusammenhang wurden zusätzlich weitere Mitglieder der IAP-Familie sowie Cdk2 auf eine mitogene Aktivierbarkeit überprüft. Dazu wurden von vier gesunden Spendern mononukleäre Zellen aus humanem Blut (PBMC) isoliert und, wie bereits in Material und Methoden beschrieben, kultiviert und mit ConcanavalinA und Phorbolester stimuliert (**Abb. 3.36**).

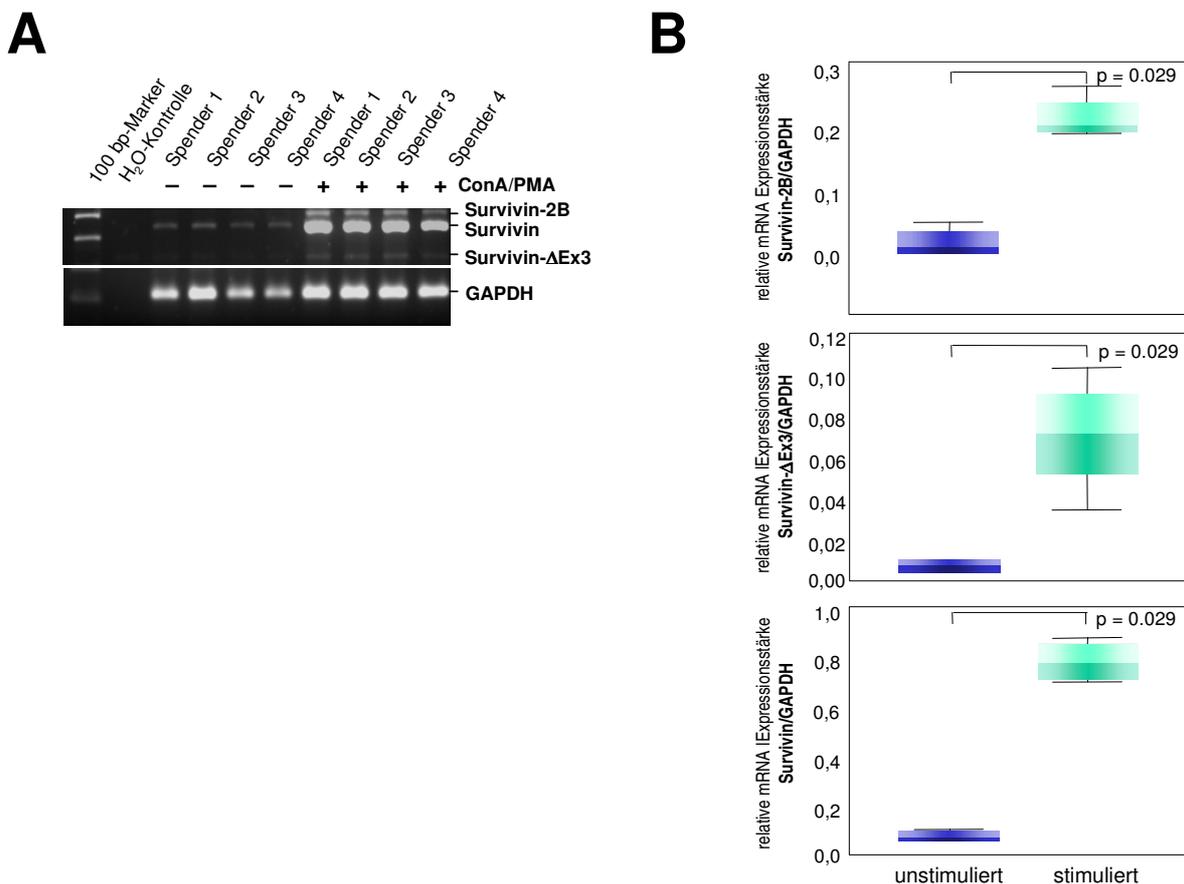


Abb 3.36: Induktion der Survivinvarianten in PBMCs

Hierbei war mittels RPA eine Survivin-Expression in stimulierten, nicht jedoch in unstimulierten mononukleären Zellen nachweisbar.

Mit Hilfe der sensitiveren RT-PCR-Analyse konnten jedoch schwache Survivin-Signale auch in ruhenden, nicht-stimulierten PBMCs detektiert werden. Die beiden alternativen Spleißvarianten Survivin- Δ Ex3 und -2B waren nur in stimulierten Zellen auf Transkriptebene mittels RT-PCR-Verfahren erfaßbar. Wie man aus der Box-Blot-Darstellung erkennen kann, ist diese durch mitogene Stimulation bedingte Induktion der Survivinexpression für alle drei Survivin-Varianten als statistisch signifikant anzusehen.

Um zu überprüfen, ob die mitogene Stimulation peripherer, mononukleärer Zellen auch zu einer Induktion anderer Mitglieder der IAP-Familie und der Cyclin-abhängigen Kinase 2 sowie der apoptoseinduzierenden DAP und DAP-Kinase führt, wurde zusätzlich deren RNA-Expression mittels RPA-Analyse untersucht (**Abb. 3.37**).

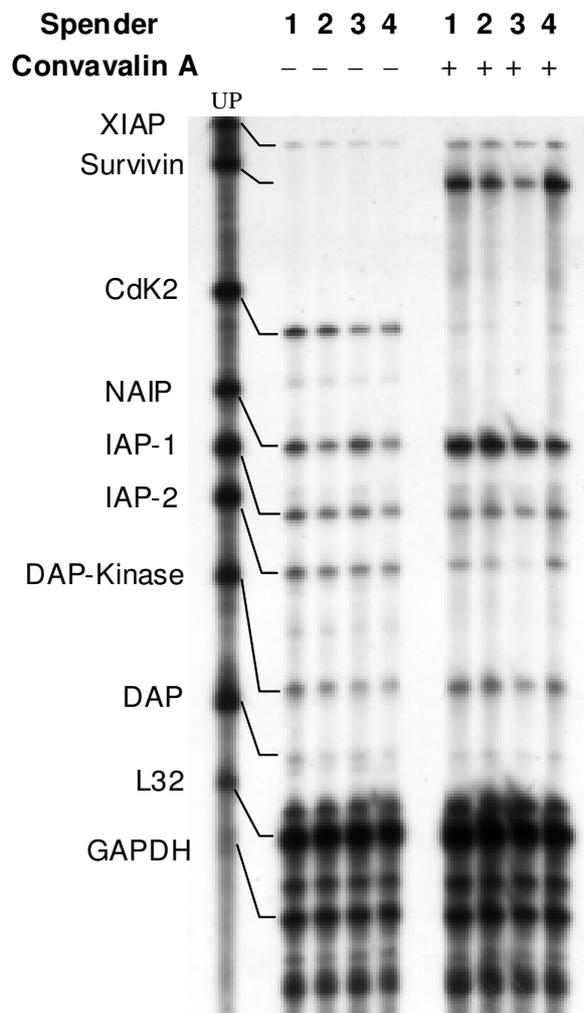


Abb. 3.37: Expression der IAP-Familie sowie CdK2, DAP und DAP-kinase in unstimulierten und stimulierten PBMCs

Hierbei ergab sich für XIAP und NAIP, nicht jedoch für IAP-1, ebenfalls eine statistisch signifikante Zunahme der Transkripte, während IAP-2 eine Abnahme der mRNA-Expression aufwies (**Abb. 3.38**). Auffällig ist auch die entgegengesetzt zur Expressionssteigerung von Survivin, IAP-1 und XIAP abnehmende Expression von Cdk2 (**Abb. 3.39**). Für DAP-Kinase konnte lediglich eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Zunahme der mRNA und für DAP eine tendenzielle, allerdings ebensowenig signifikante Abnahme der Transkription detektiert werden.

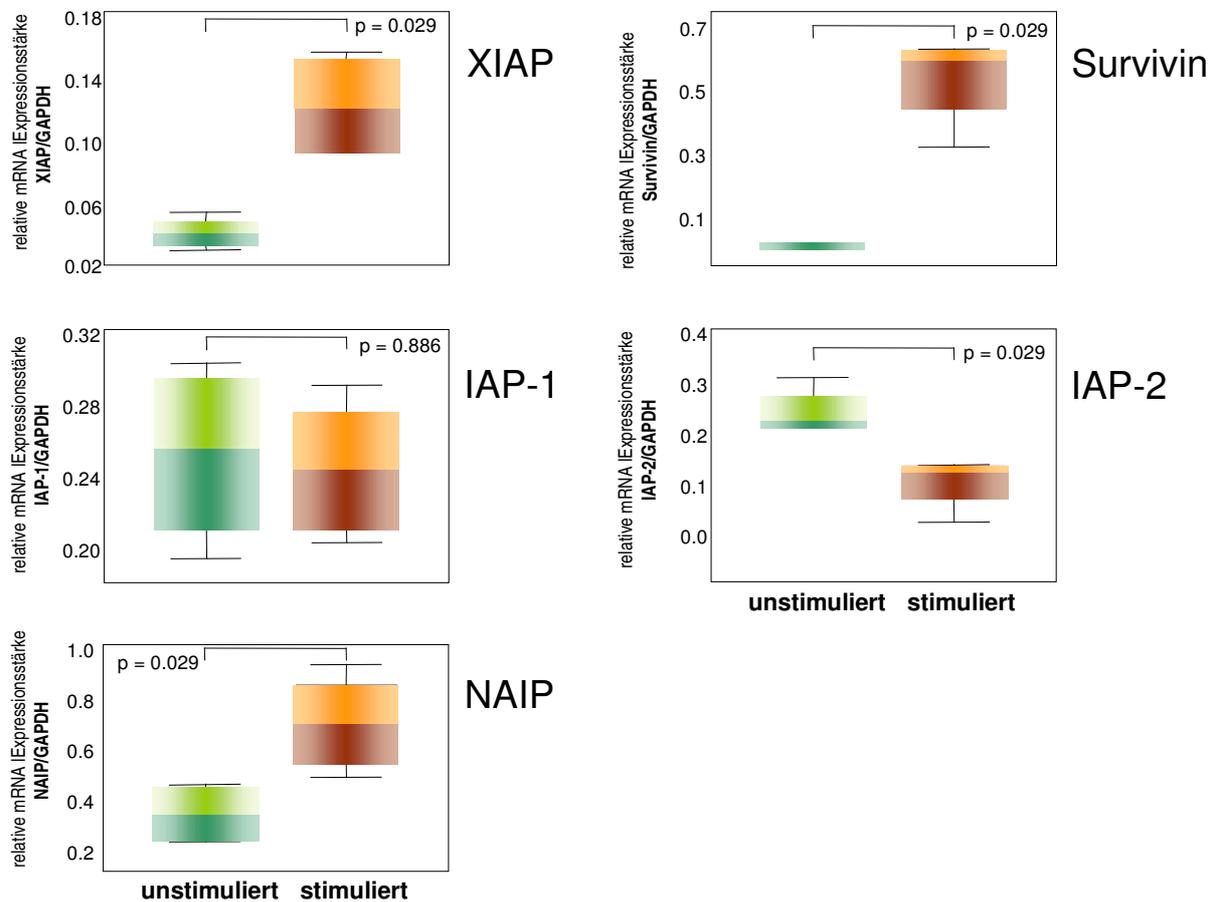


Abb. 3.38: Statistische Auswertung der densitometrisch ermittelten Verteilung der IAP-Mitglieder in PBMCs. Grün = unstimuliert, braun = stimuliert

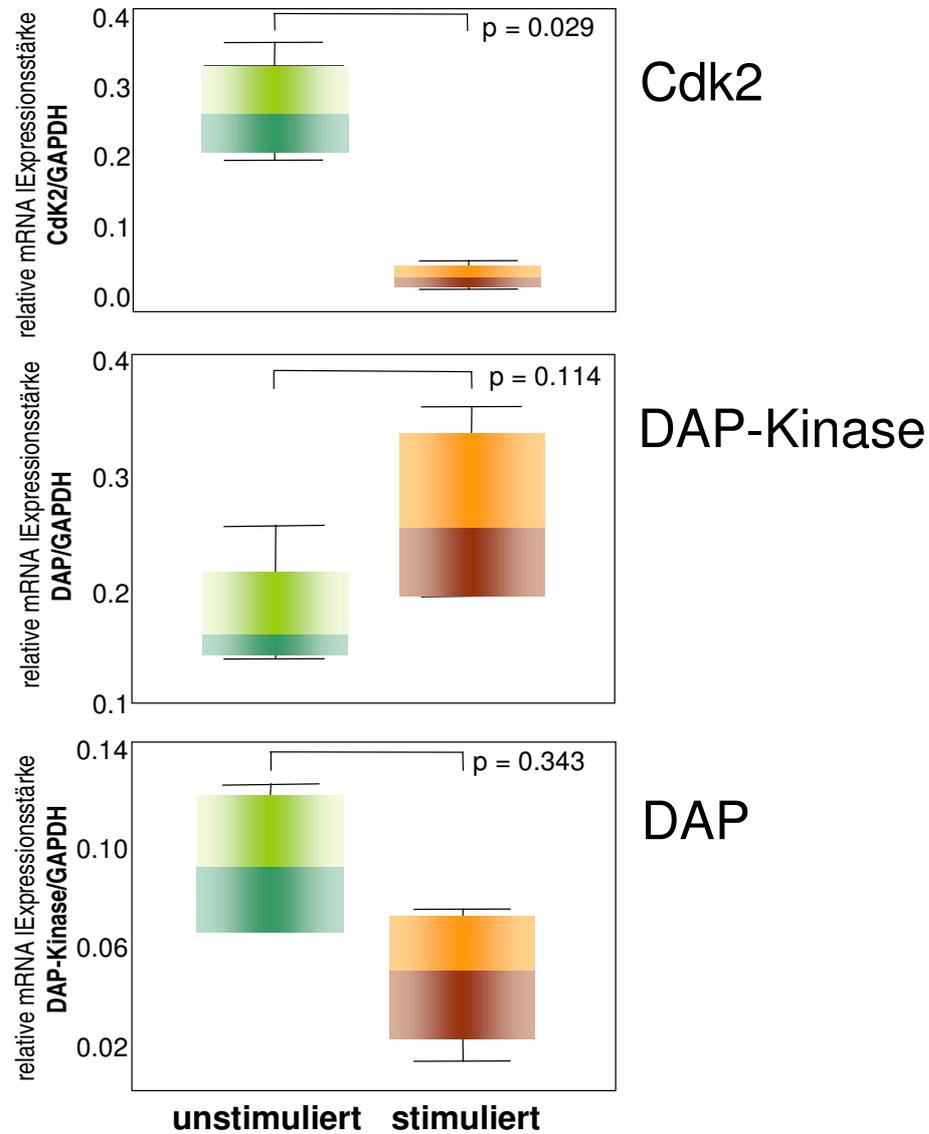


Abb. 3.39: Statistische Auswertung der densitometrisch ermittelten Verteilung von Cdk2, DAP-Kinase und DAP in PBMCs: grün = unstimuliert, braun = stimuliert

In der Western-Blot-Analyse ließ sich die auf Transkriptebene nachgewiesene Induktion der Survivin- und XIAP-Expression nach mitogener Stimulation mit ConcanavalinA auch auf Proteinebene bestätigen (**Abb. 3.40**). Auch hier konnte in unstimulierten peripheren mononukleären Blutzellen für Survivin kein Survivin-Protein detektiert werden. Erst nach

Stimulation wurden Signale dieses Apoptoseinhibitors nachweisbar. Die mitogene Stimulation führte in vergleichbarer Weise zu einer Zunahme der Expression des XIAP-Proteins. Dies weist auf eine korrespondierende Induktion, sowohl auf mRNA- und Proteinebene, von Survivin und XIAP nach Stimulation mit ConcanavalinA.

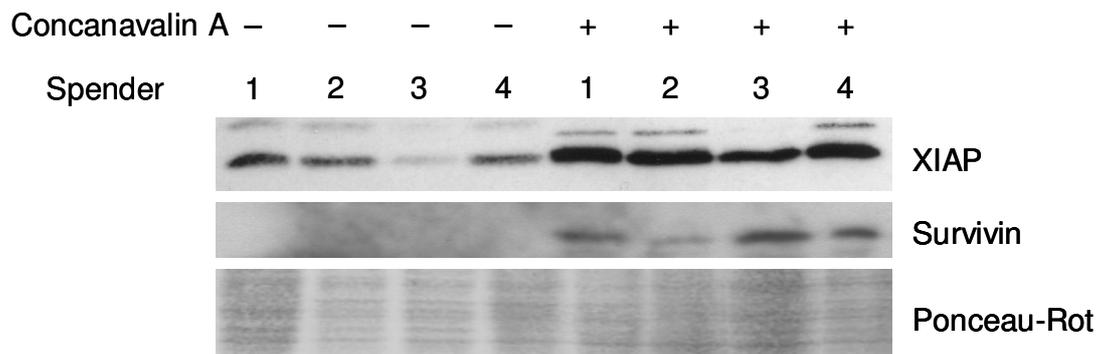


Abb. 3.40: Expression von XIAP und Survivin auf Proteinebene in unstimulierten (-) und stimulierten (+) PBMCs

IV. DISKUSSION

IV. 1 Das TRAIL-System im Nierenzellkarzinom

IV. 1. 1 Die Expression des TRAIL-Systems

Das TRAIL System hat in den letzten Jahren seit der Entdeckung und Charakterisierung seines Liganden durch WILEY et al. (1996) und PITTI et al. (1997) zunehmend an Aufmerksamkeit gewonnen.

Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der TNF-Superfamilie, deren Expression auf aktivierte T-Zellen, Natural-Killer-Zellen und andere immunprivilegierte Zellen restringiert ist, wird TRAIL in zahlreichen humanen Geweben, insbesondere in Milz, Prostata, Lunge, Gehirn, Leber und Hoden exprimiert (WILEY et al. (1996), PITTI et al. (1997), RIEGER et al. (1999)). Neben seiner Verbreitung in normalen Geweben ist TRAIL ebenso in neoplastisch transformierten Geweben nachweisbar. Seine Todesrezeptoren TRAIL-R1/DR4 und TRAIL-R2/DR5 werden nahezu in den gleichen nicht-neoplastischen Geweben und Tumorzelllinien koexprimiert wie TRAIL. Dagegen scheint die Expression des antagonistierenden TRAIL-Rezeptors vom Typ 3/DcR1 (PAN et al. (1997), SHERIDAN et al. (1997), MACFARLANE et al. (1997)) nur auf wenige Gewebe beschränkt zu sein. So wird DcR1 insbesondere in normalen humanen Geweben wie peripheren Blutleukozyten, Milz, Herz, Plazenta, Leber, Lunge Skelettmuskulatur, Niere und Pankreas überexprimiert, während es nur in wenigen Zelllinien verschiedener Tumortypen gering exprimiert wird (PAN et al. (1997), SHERIDAN et al. (1997), MACFARLANE et al. (1997). TRAIL-R4/DcR2 hingegen ist wiederum in zahlreichen normalen humanen Geweben als auch in Tumorzelllinien nachweisbar (DEGLI-ESPOSTI et al. (1997), MARSTERS et al. (1997)).

Die in der Literatur beschriebene, weit verbreitete Expression von TRAIL und seinen Rezeptoren konnte durch die Analyse der Grundexpression des TRAIL-Systems in 31 Nierenkarzinom-Zelllinien der drei häufigsten histologischen Typen komplettiert werden. Es konnte in allen bis auf zwei untersuchten Nierenkarzinom-Zelllinien eine Koexpression von TRAIL und seinen Rezeptoren ermittelt werden, während der antagonistische TRAIL-Rezeptor Typ 3 nur in wenigen Zelllinien auf einem besonders niedrigen Expressionsniveau detektierbar war. Diese Ergebnisse sind mit den bisherigen Expressionsanalysen in Tumorzelllinien verschiedener Tumorentitäten vereinbar und weisen auf ein generelles

Expressionsmuster im Rahmen der Tumorgenese humaner Neoplasien hin. Auffällig erscheint weiterhin die nahezu homogene Expression des TRAIL-Rezeptors DcR2 im Gegensatz zu der eher heterogenen Verteilung anderen Komponenten des TRAIL-Systems.

Obwohl der apoptoseinduzierende Ligand TRAIL in relativ hohem Expressionsniveau neben seinen Todesrezeptoren koexprimiert wird, scheinen diese Tumorzelllinien und Gewebe einen protektiven Mechanismus zu besitzen, der den Fratrizid verhindert und eine ungestörte Zellproliferation ermöglicht. Zum einen könnte die gleichzeitige Expression der TRAIL-antagonisierenden Rezeptoren durch Abfangen von TRAIL die Apoptoseinduktion inhibieren. Dieser funktionelle Ansatz wird jedoch derzeit kontrovers diskutiert, da einige Arbeiten keine überzeugende Korrelation zwischen TRAIL-Sensitivität und dem Expressionsstatus von DcR1 und DcR2 in humanen Tumorzelllinien als auch in Keratinozyten zeigen konnten (RIEGER et al. (1998), GRIFFITH et al (1998), ZHANG et al (1999), LEVERKUS et al (2000).

Auf der anderen Seite könnte die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B über TRAIL-R1, -R2 und -R3 – und damit konsekutiv von Apoptoseinhibitoren wie Mitgliedern der IAP-Familie – die Apotoseresistenz im Tumorzellverband als auch im Normalgewebe verursachen.

IV.1.2 Die Entdeckung alternativer Spleißvorgänge im TRAIL-System

Das alternative Spleißen von prä-mRNA ist ein bekannter Mechanismus, der für zahlreiche Gene beschrieben wurde (JIANG und WU 1999), die auf verschiedenen Stufen der Signalkaskade des programmierten Zelltodes eingeschaltet sind. Dabei findet sich dieser Vorgang zum einen bei membranassoziierten Todesrezeptoren wie CD95, den terminalen proteolytischen Effektorenzymen der Apoptose, den Caspasen, aber auch bei antiapoptotischen Genfamilien wie bei dem in dieser Arbeit untersuchten Survivin und der Bcl-2-Familie. So führt das alternative Spleißen neben der klassischen membrangebundenen CD95-Variante zu einer membrangebundenen Variante mit Verlust der Todesdomäne und löslichen Isoformen, die eine CD95-Ligand-vermittelte Apoptose inhibieren (RUBERTI et al. 1996, CASCINO et al. 1995 und 1996). Dies läßt vermuten, daß alternative Spleißvorgänge im Rahmen der Apoptosefeinregulation eine zentrale Rolle spielen. Auch im TRAIL-System konnte für den agonistischen TRAIL-Rezeptor 2 die Existenz zweier TRAIL-R2-Isoformen, TRICK2A und TRICK2B, von SCREATON et al. (1997) identifiziert werden. TRICK2A unterscheidet sich von TRICK2B durch eine um 29 Aminosäuren verkürzte intrazelluläre Domäne, wobei der Nachweis einer Funktionalität dieser Trunkierung noch aussteht.

Durch die Identifikation weiterer alternativer Spleißvarianten im TRAIL-System wird die Komplexität dieses Liganden-Rezeptor-Systems nun zusätzlich erhöht. So konnten mit TRAIL- β und γ zwei bislang unbekannte Isoformen von TRAIL/Apo2L, die eine Prozessierung des Exon 2 und 3 aufweisen, identifiziert werden. Zusätzlich wurde mit TRAIL-R4- β eine bislang unbekannte Variante des antagonistischen TRAIL-Rezeptors vom Typ 4 entdeckt, die durch den Verlust der extrazellulären cysteinreichen Domäne 1 *CRDI* gekennzeichnet ist. Im Gegensatz zu den alternativen TRAIL-Spleißvarianten, die in nahezu allen 31 untersuchten Nierenkarzinom-Zelllinien detektierbar waren, konnte TRAIL-R4- β interessanterweise lediglich in einer Zelllinie nachgewiesen werden. Es ist in Zukunft zu untersuchen, ob diese alternativen Spleißvarianten auch in anderen Tumorentitäten oder Normalgewebe exprimiert werden.

IV.1.3 Hypothesen zur Funktion der alternativen Spleißvarianten von TRAIL und DcR2

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, führt die Prozessierung von Exon 2 und Exon 3 zu zwei im extrazellulären Bereich massiv trunkierten Proteinen. Da der extrazelluläre Bereich des TRAIL-Proteins mit den korrespondierenden Rezeptoren interagiert, liegt die Vermutung nahe, daß sowohl TRAIL- β als auch TRAIL- γ ihre Bindungsaktivität verloren haben. Wie kristallographische Analysen des TRAIL-TRAIL-R2-Komplexes verdeutlichen, kann der Bindungsbereich zwischen TRAIL und DR5 in eine untere, zentrale und obere Kontaktregion unterteilt werden (CHA et al 2000). Eine wesentliche Rolle scheint dabei die zentrale Kontaktregion von TRAIL zu spielen, die von den Aminosäuren 131-135 des AA“ loops (AS 130-160) gebildet wird und auch bei anderen TNF-Liganden für die Rezeptorbindung verantwortlich gemacht wird. Diese Aminosäuren bilden zahlreiche, spezifische polare Interaktionen mit dem TRAIL-Rezeptor vom Typ 2 aus. So interagiert die Guanidino-Gruppe von Arg-132 mit Tyr-50 von DR5. Asn-134 und Thr-135 wiederum interagieren mit den Aminosäuren Glu-70 und Asn-81 von DR5. Auch in den anderen TRAIL-Rezeptoren finden sich solche identischen oder zumindestens homolog substituierte Bereiche. Ferner führte die Deletion der Aminosäuren 132-135 zu einer Abnahme der TRAIL-Zytotoxizität. Auch die Aminosäuren 137-152 des AA“loops und eine Kontaktregion durch die Aminosäuren 205-237 sind für die Liganden-Rezeptor-Interaktion entscheidend. Zusätzlich scheint das Cystein in Position 230 des TRAIL-Liganden für die Stabilität der aktiven trimerisierten Struktur mitverantwortlich zu sein. Im TRAIL-Trimer

komplexieren die Cysteine mit ihren Chloridionen ein Zn^{2+} im Sinne eines Chelates (HYMOWITZ et al., 1999). Sowohl die Entfernung des Zn^{2+} -Ions mit Hilfe von Chelatbildnern als auch der Austausch von Cystein durch Glycin induzierten eine deutliche Abnahme der apoptotischen TRAIL-Aktivität und eine Reduktion der Schmelztemperatur der Trimere. Eine Funktionalität der beiden alternativen Spleißvarianten, die durch direkte Bindung an die korrespondierenden TRAIL-Rezeptoren initiiert wird, scheint hingegen durch den Verlust der für die Rezeptorassoziation und Bildung von Dimeren und Trimeren verantwortlichen Bereiche sehr fraglich. Diese Annahme wurde durch erste Transfektionsversuche bestätigt (KRIEG et al. 2003). Dennoch stellt sich die Frage ob diese Varianten eine Funktionalität besitzen bzw. die Bindung der klassischen TRAIL-Isoform beeinflussen.

Dies könnte auf zwei Ebene erfolgen: **1.** postranskriptionell und **2.** direkt auf der Proteinebene. Unter Berücksichtigung der Annahme, daß beiden alternativen TRAIL-Varianten, TRAIL- β und - γ , keine direkte apoptotische Funktion zukommt, könnten diese die Synthese des funktionellen TRAILS im Rahmen der Translation negativ beeinflussen, da alle TRAIL-Varianten aus einem gemeinsamen Pool der Vorläufer pre-mRNA stammen. So könnte die Zunahme des TRAIL- β und - γ -Transkriptes eine Abnahme der apoptoseinduzierenden klassischen TRAIL-Variante bewirken. Dies könnte sowohl parakrine als auch autokrine TRAIL-Effekte reduzieren. Für die Tumorprogression könnten solche Vorgänge einen verminderten Fratrizid („Brudermord“) und somit Wachstumsvorteil der neoplastischen Gewebe bedeuten.

Die potentiellen ER-Membran-Retentionssignale im C-Terminus der erstmals beschriebenen Varianten könnten dabei eine entscheidende Rolle spielen. So ist bekannt, daß die ER-Retention die korrekte Faltung und Assoziation von heteromeren Proteinuntereinheiten garantiert und erst eine Maskierung von ER-Signalen durch die Heteromere oder eine Phosphorylierung zu einer Freisetzung der Proteine führt. So könnten möglicherweise den TRAIL-Varianten TRAIL- β und - γ wichtige Funktionen für eine korrekte Assoziation von TRAIL-Trimeren in die Zellmembran zukommen. Inwiefern dabei Heterooligomere aus TRAIL und diesen beiden Isoformen entstehen, ist spekulativ. Interessanterweise konnte für synaptische Rezeptoren wie NMDA-Rezeptoren ebenfalls eine alternative Spleißvariante der NR1-Untereinheit identifiziert werden, die ebenfalls ER-Retentionssignale mit vorgeschalteten PKC-Phosphorylierungsstellen enthalten. Erst nach Phosphorylierung dieser Signalsequenzen folgt eine Membranassoziation von NMDA-Rezeptoren (SCOTT et al. 2001). Betrachtet man nun den C-Terminus von TRAIL- β und - γ , fallen neben dem identifizierten ER-Retentionssignal daran angrenzende PKC-Phosphorylierungsstellen auf. Wird die subzelluläre

Lokalisation der TRAIL-Isoformen näher betrachtet, erscheint auf den ersten Blick die cytoplasmatische Lokalisation eines membranären TRAIL-Proteins sehr überraschend. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß TRAIL primär cytoplasmatisch lokalisiert ist und erst nach Stimulation, u.a. mit dem PKC stimulierenden PMA, an der Plasmamembran detektiert werden kann. Ob die oben angesprochenen Mechanismen für die Membranassoziation in Frage kommen, gilt es in Zukunft zu untersuchen.

Für die identifizierte Spleißvariante des TRAIL-Rezeptors vom Typ 4, könnte die Trunkierung der cysteinreichen Domäne bedeutsam sein. Wie CHA et al. (2000) und HYMNOWITZ et al. (1999) aus kristallographischen Untersuchungen analysierten, werden die cysteinreichen Domänen der TRAIL-Rezeptoren für die Rezeptor-Liganden-Interaktion verantwortlich gemacht. Eine Veränderung in diesen Domänen, wie sie für die neu beschriebene TRAIL-R4-Isoform nachgewiesen werden konnte, könnte somit in jeglicher Weise die Affinität gegenüber der TRAIL-Liganden-Bindung beeinflussen. Dies könnte eine zusätzliche Feinregulation der TRAIL-Sensitivität im Falle einer Co-Expression der entsprechenden Isoformen an der Zelloberfläche ermöglichen.

IV.2 Die Bedeutung der IAP-Familie im Nierenzellkarzinom

IV. 2.1 Die Rolle der IAPs im Rahmen einer Sensitivierung der TRAIL-induzierten Apoptose in Nierenkarzinom-Zelllinien durch Topotecan

Seitdem bekannt wurde, daß TRAIL das Potential besitzt, den apoptotischen Zelltod in Tumorzellen zu induzieren, ohne dies in den meisten, nicht transformierten Zellen zu erreichen (GURA 1997, SHERIDAN et al. 1997, WALCZAK et al. 1997, ASHKENAZI et al. 1999, DEJOSEZ et al. 2000, RAMP et al. 2003), hat TRAIL als mögliches, potentes Therapeutikum gegen maligne Tumoren hohes Interesse erzielt. Zahlreiche in vitro Studien konnten zeigen, daß viele Zelllinien von Neoplasien der Lunge, des Kolon, der Prostata, der Brust und der Niere sensitiv gegenüber einer TRAIL-induzierten Apoptose sind (GURA 1997, SHERIDAN et al. 1997, WALCZAK et al. 1997, ASHKENAZI et al. 1999, DEJOSEZ et al. 2000, RAMP et al. 2003). Dies konnte auch in Tierversuchen in Form von Xenograftmodellen nachgewiesen werden. Die Behandlung von Mäusen mit rekombinantem löslichem TRAIL, denen zuvor TRAIL-sensitive Mammakarzinom-, Kolonkarzinom- oder Gliom-Zellen inokuliert wurden, supprimierte das Wachstum und führte zur Regression der Tumoren ohne generalisierte

Zytotoxizität, wie sie für CD95L und TNF α beschrieben worden war (WALCZAK et al. 1999, ASHKENAZI et al. 1999).

Die Beobachtung, daß eine Schädigung der DNA, wie sie auch durch Chemotherapeutika induziert wird, zu einer Hochregulation des agonistischen TRAIL-Rezeptors vom Typ 2 in neoplastischen Zellen führte, läßt die Überlegung zu, daß durch diese Rezeptor-Hochregulation die TRAIL-Zytotoxizität gesteigert wird. Die sich daraus ergebenden Vorteile sind naheliegend. So könnten primär TRAIL-resistente Tumorzellen durch eine synergistische Aktivierung des apoptotischen Signalweges gegenüber rh-TRAIL sensitiviert werden. Tatsächlich konnten NAGANE et al. (2000) in Gliom-Zellen eine Hochregulation des Todesrezeptors DR5 nach Behandlung mit subletalen Dosen Cisplatin und Etoposid nachweisen. Die isolierte Gabe von Cisplatin oder Etoposid führte in den meisten Zelllinien nicht zum programmierten Zelltod, während die Kombination mit rhTRAIL eine synergistische Verstärkung der TRAIL-induzierten Apoptose ergab. Auch die Kombination von rhTRAIL mit anderen Chemotherapeutika wie Topotecan, 5-Fluorouracil, Doxorubicin und Camptothecin erzeugt *in vitro* in Nierenzell-, Kolon-, Mamma- und Harnblasenkarzinomzelllinien eine Sensitivierung gegenüber TRAIL (KEANE et al. 1999, GLINIAK et al. 1999, DEJOSEZ et al. 2000).

Die Mechanismen der TRAIL-Resistenz und Sensitivierung sind nicht bekannt. Mögliche Ansatzpunkte zur Klärung dieser Mechanismen könnten sich aus der Regulation des TRAIL-Signalweges ergeben. Die primäre TRAIL-Resistenz könnte zum einen durch die beschriebenen Mutationen der TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 im Bereich ihrer Todesdomänen verursacht sein (SHIN et al. 2001, LEE et al. 2001, McDONALD et al. 2001, OZOREN et al. 2000, LEE et al. 1999). Zum anderen könnte die TRAIL-Sensitivität auf intrazellulärer Ebene reguliert werden (GRIFFITH et al. 1998, SIEGMUND et al. 2002, SAYERS et al. 2003). Dafür spricht die durch c-FLIP inhibierte TRAIL-vermittelte Apoptose und die Korrelation des c-FLIP-Expressionslevels zur TRAIL-Resistenz in Melanom-Zellen (GRIFFITH et al. 1998). Darüber hinaus führte die Abnahme der c-FLIP-Expression nach Actinomycin D oder Cycloheximid zur Sensitivierung gegenüber rhTRAIL (GRIFFITH et al. 1998). Der Einfluß von Bcl-2 oder Bcl-X_L auf die Resistenz gegenüber rhTRAIL hingegen scheint kontrovers und eher zelltypspezifisch. Während WALCZAK et al. (2000) und KEOGH et al. (2000) keine Beteiligung dieser Apoptaseinhibitoren, die auf der mitochondrialen Ebene wirken, zeigen konnten, schützte eine Bcl-2-Überexpression in der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie PC3 vor dem programmierten Zelltod durch TRAIL (ROKHLIN et al. 2001).

Welche Rolle der IAP-Familie im TRAIL-Signalweg und an der Resistenzvermittlung gegenüber TRAIL zukommt, wurde bislang nicht untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß nach Topotecan-Gabe sowohl in der TRAIL-sensitiven klarzelligen Zelllinie clearCa-6 als auch in der chromophilzelligen Nierenkarzinom-Zelllinie chromphi-3 eine Abnahme der Expression der IAP-Mitglieder auf mRNA-Ebene mit einer Zunahme der TRAIL-Sensitivität verbunden war. Während die Zelllinie clearCa-6 eine hohe TRAIL-Sensitivität zeigte, wies die chromophilzellige Zelllinie eine deutliche Resistenz auf. Interessanterweise kam es jedoch nach Zugabe von rhTRAIL zu einer Expressionssteigerung der IAP-Mitglieder Survivin, IAP-1 und NAIP in clearCa-6 bei gleichzeitiger Reduktion der Lebendzellzahl. Hingegen fehlte in der TRAIL-resistenten Zelllinie Chromphi-3 weitestgehend eine Induktion der IAPs auf mRNA-Ebene. Die TRAIL-Sensitivität trotz gleichzeitiger Aktivierung von Apoptoseinhibitoren könnte dadurch erklärt werden, daß möglicherweise die gleichzeitige Induktion des TRAIL-vermittelten Apoptoseignalweges überwiegt, da die Expression von Survivin, IAP-1 und NAIP nur einen geringen Einfluß auf die Apoptoseinhibition haben. Ferner führte die TRAIL-Gabe auch zur Induktion des DAP/DAP-kinase-Systems in der primär TRAIL-sensitiven Linie clearCa-6, die sich in chromphi-3 nicht nachweisen ließ und die ganz wesentlich zur TRAIL-Sensitivität beitragen könnte.

Die Involvierung der IAPs im Rahmen der Topotecan-Behandlung ist sehr auffällig. So induziert Topotecan in beiden untersuchten Zelllinien eine Abnahme der Expression insbesondere des Apoptoseinhibitors IAP-2. Auffällig ist, daß der Grad der Abnahme der IAP-2-Expression wie auch der Grad der Zellzahlreduktion in beiden Zelllinien vergleichbar scheint. Somit könnte die IAP-2-Reduktion zur Wirkung von Topotecan beitragen. Es ist bekannt, daß IAP-2 ein Inhibitor der terminalen Caspasen ist, die im Rahmen der Apoptose den Zelltod induzieren und durch ein vermindertes IAP-2-Level somit dieser Inhibition entgehen könnten. Damit könnte auch die Sensitivierung beider Nierenkarzinomzelllinien gegenüber rhTRAIL nach Topotecan-Gabe erklärt werden. Die Suppression des IAP-2-Niveaus würde eine Zunahme der Caspase-Aktivität nach rhTRAIL-Gabe möglich machen. Eine vergleichbare Wirkung für Cisplatin auf die Expression des Apoptoseinhibitor XIAP in humanen Ovarialkarzinomen konnten Li et al. (2001) auch nachweisen. Die Gabe von Cisplatin führte in Cisplatin-sensitiven Zellen, nicht jedoch in Cisplatin-resistenten Ovarialkarzinom-Zelllinien, zu einer Abnahme der XIAP-Expressivität. Gleichzeitig korrelierte auch in dieser Arbeit die Abnahme der XIAP-Expression mit der Häufigkeit der Apoptoseinduktion.

IV.2.2 Die Bedeutung der IAP-Familie im Nierenzellkarzinom und mononucleären Zellen des peripheren Blutes

IV.2.2.1 Die stadienabhängige Expression von Survivin und seinen beiden alternativen Spleißvarianten in humanen Neoplasien

Wie bereits erwähnt, ist Survivin im Gegensatz zu allen anderen Mitgliedern der IAP-Familie zum einen massiv in humanen Neoplasien überexprimiert, zum anderen aber auch an der Regulation von Apoptose und des Zellzyklus beteiligt.

Entgegengesetzt zur weit verbreiteten Expression anderer IAPs in fötalem als auch in adultem Gewebe, wird Survivin intensiv in fötalem, nicht jedoch in den meisten differenzierten adulten Geweben exprimiert. Interessanterweise wurde in den meisten humanen Neoplasien eine Survivin-Reexpression nachgewiesen, die sowohl zur Tumorprogression als auch zu einer erhöhten Resistenz gegenüber apoptotischer Stimuli wie Chemotherapeutika und Bestrahlung beitragen könnte. So konnten zahlreiche Arbeiten zeigen, daß eine Survivin Re-expression einen prognostischen Faktor für den Krankheitsverlauf von Patienten mit Karzinomen des Gastrointestinaltraktes wie Ösophaguskarzinom (KATO et al. 2001), Magenkarzinom (Lu et al. 1998), Colorektalkarzinom (KAWASAKI et al. 1998, SARELA et al. 2000), sowie bei Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (MONZO et al. 1999), Neuroblastomen (ADIDA et al. 1998, ISLAM et al. 2000) und Mammakarzinom (TANAKA et al. 2000) darstellt und mit mit einer niedrigen Überlebensrate der Patienten statistisch korreliert. Interessanterweise konnten KATO et al. (2001) eine signifikant geringere Survivinexpression in Ösophaguskarzinomen von Patienten nachweisen, die eine partielle Remission nach präoperativer Chemotherapie aufwiesen im Gegensatz zu Patienten ohne Änderung oder sogar progressiver Erkrankung.

Bislang wurde in keiner der vorliegenden Arbeiten die Expression der beiden alternativen Survivinvarianten in Tumorgeweben *in vivo* überprüft und deren Abhängigkeit von Tumorstadium und anderen „klinikopathologische Parameter“ untersucht. So zeigen zum einen die Ergebnisse der RT-PCR-Analysen in Nierenzellkarzinomen erstmals eine *in vivo*-Expression der von MAHOTKA et al. (2000) zunächst nur *in vitro* in RCC-Zelllinien identifizierten Survivin-Varianten. Darüber hinaus konnte eine stadienabhängige Abnahme der Expression von Survivin- Δ Ex3 und -2B bei unverändertem Expressionsniveau der klassischen Survivin-Variante in fortgeschrittenen pT3-Tumorstadien der klarzelligen Nierenkarzinome nachgewiesen werden. Zusätzliche zeigte sich eine signifikant höhere Expression aller drei Survivinvarianten in der Gruppe der aggressiveren klarzelligen Nierenkarzinome gegenüber der Gruppe der chromophilzelligen Karzinome. In gleicher Weise konnte erstmals im Magenkarzinom die *in vivo* Expression der Survivinvarianten nachgewiesen werden, wobei

ebenfalls eine stadienabhängige signifikante Abnahme der Survivin-2B-Expression beobachtet wurde (KRIEG et al. 2002).

Obwohl mit der Survivinexpression sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene ein prognostischer Faktor für die Tumorprogression identifiziert wurde, konnte sowohl bei Nierenkarzinomen als auch bei Magenkarzinomen keine Korrelation zwischen Tumorstadium und Differenzierungsgrad einerseits und der Expressionsstärke der klassischen Survivinvariante andererseits festgestellt werden. Diese Beobachtung deckt sich allerdings auch mit den Befunden bisher publizierter Arbeiten. So konnte lediglich in Neuroblastomen eine Korrelation der Survivinexpression mit klinisch aggressiverer und histologisch fortgeschrittener Erkrankung als auch im Ösophaguskarzinom zur Progression der Lymphknotenmetastasierung gefunden werden (KATO et al. 2001). Möglicherweise ist dieses Phänomen vom Tumortyp abhängig, es könnte jedoch auch, wie es in der vorliegenden Tumoranalyse zum Nierenzellkarzinom gezeigt werden konnte, bei gleichbleibender Survivinexpression eine Abnahme von nicht-anti-apoptotischen Survivin-2B in fortgeschrittenen Tumorstadien eine Netto-Zunahme der anti-apoptotischen Survivinvarianten bedingen. Ein weiteres Problem stellt die eher subjektive Interpretation des Differenzierungsgrades da. Ferner werden Tumoren als Differenzierungsgrad G3 nach WHO kategorisiert auch wenn sie nur kleine G3-Areale aufweisen, die möglicherweise in dem untersuchten Proben, die in die RT-PCR-Analyse gingen, nicht anwesend waren und umgekehrt.

Im Gegensatz dazu zeigt die nicht-antiapoptotische Survivin-2B-Variante in fortgeschrittenen Tumorstadien sowohl im Nierenzellkarzinom als auch im Magenkarzinom eine signifikante Abnahme der Expressionsstärke. Diese stadienabhängige Abnahme der Expression ließ sich ebenfalls für die anti-apoptotische Variante Survivin- Δ Ex3 statistisch signifikant im Nierenzellkarzinom, allerdings nur tendenziell und nicht signifikant auch im Magenkarzinom nachweisen. Möglicherweise lag die fehlende Signifikanz im Magenkarzinom an dem kleinen Patientenkollektiv und könnte durch höhere Fallzahlen erzielt werden. Insbesondere die Abnahme von Survivin-2B könnte die Empfindlichkeit gegenüber dem programmierten Zelltod auf zwei Wegen beeinflussen. So könnte die Abnahme des Survivin-2B-Transkripts die gesteigerte Synthese der anti-apoptotischen Survivinvarianten Survivin und Survivin- Δ Ex3 ermöglichen, da alle drei Survivinvarianten aus einem gemeinsamen Pool einer Vorläufer-mRNA gebildet werden. Die antiapoptotischen Survivineffekte könnten zusätzlich an Dominanz gewinnen, wenn Survivin-2B als natürlicher Antagonist durch Konkurrenz um die Bindung an den Interaktionspartnern der Survivinvarianten wirkt.

Interessanterweise fand sich in chromophilzellig/papillären Nierenzellkarzinomen, die sich vom klarzelligen Nierenkarzinom in zahlreichen Aspekten wie Histomorphologie, zytogenetischen Aberrationen, Reaktivität gegenüber Wachstumsfaktoren und klinischer Aggressivität unterscheiden (VAN DEN BERG et al. 1993, GERHARZ et al. 1996, RAMP et al. 2000) auch in Bezug auf die Expression aller drei Survivinvarianten ein Unterschied. Sowohl die Expression der Survivin-Spleißvarianten als auch die mRNA-Quotienten zwischen antiapoptotischem Survivin und Survivin- Δ Ex3 gegenüber der nicht-antiapoptotischen Survivin-2B-Variante erwiesen sich in chromophilzelligen Nierenzellkarzinomen kleiner als in klarzelligen Nierenkarzinomen. Da insbesondere die Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod die Tumoraggressivität bestimmt, könnte der günstigere klinische Verlauf des chromophilzellig/papillären Karzinoms mit dem gegenüber dem aggressiveren klarzelligen Karzinom niedrigeren Expressionslevel von antiapoptotischen Survivinvarianten zusammenhängen.

LU et al. (1998) konnten immunhistochemisch auf Proteinebene in Magenkarzinomen vom intestinalen histologischen Typ ohne lymphatische Invasion eine stärkere Survivinexpression nachweisen als in dem prognostisch ungünstigeren diffusen Typ mit lymphatischer Invasion. Demgegenüber ergab sich in dem hier vorliegenden Kollektiv für die verschiedenen histologischen Magenkarzinomtypen vom intestinalen, diffusen und gemischten Typ weder eine Korrelation zur Expression Survivin noch zu den alternativen Spleißvarianten. Diese unterschiedlichen Befunde könnten durch eine Diskrepanz zwischen mRNA-Expressionsstatus und der Expression auf Proteinebene bedingt sein. Da bislang jedoch keine kommerziellen Antikörper zur Verfügung stehen, mit denen die drei Survivinvarianten immunhistochemisch diskriminierbar wären, konnten proteinchemische Untersuchungen zur Klärung einer möglichen Diskrepanz zwischen mRNA- und Proteinebene nicht durchgeführt werden. Es ist noch zu erwähnen, daß weitere durch LU et al. (1998) untersuchte klinikopathologischen Variablen wie Blutgefäßinvasion, Patientenalter und Tumorstadium – in Übereinstimmung mit unseren Befunden – keine signifikante Korrelation zur Expression der klassischen Survivinvariante zeigten.

IV.2.2.2 Die Expression der IAP-Familie in peripheren Blutzellen des mononukleären Systems

Der programmierte Zelltod spielt nicht nur im Rahmen der Tumorprogression eine zentrale Rolle, sondern ist auch von essentieller biologischer Bedeutung für die Homöostase eukaryotischer Organismen. So kommt es nach Aktivierung von ruhenden T-Zellen durch Antigene, IL-2 Stimulation oder Cross-linking des T-Zell-Rezeptors *TCR* zu einer Hochregulation von CD95 und CD95L auf der gleichen Zellpopulation, wobei diese Zellpopulation initial trotzdem resistent gegenüber dem programmierten Zelltod bleibt. Diese initiale Apoptoseresistenz ist für die physiologische Proliferation im Rahmen immunologischer Prozesse von großer Bedeutung. Bislang konnten einige antiapoptotische Gene wie FAP-1 (ZHOU et al. (1998)), FLIP (IRMLER et al. (1997), ALGECIRAS-SCHIMNICH et al. (1999)) und Bag-1 (TAKAYAMA et al. (1995)) als funktionelle Inhibitoren gegenüber der Fas-induzierten Apoptose nach T-Zell-Aktivierung identifiziert werden. KOBAYASHI et al. konnten für das murine IAP-Homolog TIAP, das eine 84%-ige Identität zum humanen Survivin aufweist, eine Expressionssteigerung in murinen T-Zellen nach selektiver Stimulation mit dem Lectin ConcanavalinA nachweisen, so daß auch die Mitglieder der IAP-Familie im Rahmen der physiologischen Proliferation eine funktionelle Rolle spielen können. Weitere Hinweise für die Bedeutung der IAP-Familie im Rahmen der physiologischen Zellhomöostase im humanen System liefern unsere Untersuchungen an humanen PBMCs. So stimmt der Nachweis der Expressionssteigerung von Survivin in diesen Zellen mit den eingangs beschriebenen Beobachtungen, aber auch mit den Untersuchungen zur Survivinexpression in humanen PBMCs, die vor kurzem von KORNACKER et al. (2001) publiziert wurden, überein. Kompliziert wird dieser Befund jedoch zusätzlich durch die gleichzeitig zur Survivininduktion stattfindende Steigerung der Expression von Survivin- Δ Ex3 und -2B. Somit läßt sich eine Beteiligung dieser beiden alternativen Spleißvarianten an der Feinregulation der Survivinfunktionen im Rahmen der T-Zell-Proliferation postulieren. Ferner läßt die RPA-Analyse, wie die Boxplot-Darstellung der densitometrischen Auswertung zeigt, für die Apoptoseinhibitoren XIAP und IAP-2 ebenfalls eine physiologische Rolle während der Immunantwort vermuten. Interessanterweise war – im Gegensatz zur selektiven Induktion der Survivinvarianten und von XIAP sowie zum gleichbleibenden Expressionstatus von IAP-2 – für IAP-1 und NAIP jedoch eine deutliche Expressionsabnahme zu verzeichnen. Über welche Signalwege die Expressionssteigerung oder auch –abnahme der IAP-Mitglieder im Rahmen der mitogenen T-Zell-Stimulation induziert wird, ist bislang nicht geklärt. Zumindestens im Fall von XIAP und IAP-2 läßt sich eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors

NF- κ B vermuten, dessen Aktivierung im Sinne einer nukleären Translokation sowohl im Rahmen immunologischer Prozesse durch zahlreiche Zytokine (wie z.B. IL-2) aber auch durch mitogen Substanzgruppen wie Lectine und Phorbolster erfolgt.

Für die Transkriptionssteigerung von Survivin und seinen alternativen Spleißvarianten konnte bislang jedoch keine Abhängigkeit zum NF- κ B-System gezeigt werden, so daß dieser Aktivierungsweg noch bewiesen werden müßte.

V. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Expressionsstatus des TRAIL-Systems in humanen Nierenkarzinomzelllinien vom klarzelligen, chromophil/papillären und chromophoben Typ untersucht. Dabei konnten erstmals zwei bislang unbekannte alternative Spleißvarianten von TRAIL identifiziert und charakterisiert werden. In der TRAIL- β -Isoform kommt es, wie Computeranalysen zeigten, durch den Verlust des Exon 3 zu einer Verschiebung des Leserahmens und damit zu einem neuen Stopcodon, welches zur Translation eines trunkierten, 98 Aminosäuren umfassenden Protein mit Verlust der extrazellulären Domäne führt. Die zusätzliche Prozessierung von Exon 2 führt ebenfalls zur Generation eines neuen Stopcodons und darüber hinaus zur TRAIL- γ -Variante mit 52 Aminosäuren und nahezu kompletter Trunkierung der extrazellulären Bindedomäne. Durch den Verlust der extrazellulären Domäne der von uns erstmals beschriebenen TRAIL-Varianten, die für die Signalinduktion durch Rezeptorbindung essentiell erscheint, ist eine apoptotische Wirkung sehr fraglich. Darüber hinaus wurde mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie die subzelluläre Lokalisation der TRAIL-Spleißvarianten in Form von GFP-Fusionsproteinen untersucht. Während TRAIL- α und - β eine zytoplasmatische Lokalisation aufwiesen, zeigte TRAIL- γ eine membranäre, perinukleäre sowie endoplasmatische Akkumulation.

Neben diesen Isoformen des TRAIL-Liganden konnte weiterhin eine bislang nicht identifizierte Spleißvariante des TRAIL-Rezeptors vom Typ 4 entdeckt werden. Diese Form weist eine Trunkierung der cysteinreichen Domäne 1 auf, die für die Liganden-Rezeptor-Interaktion wichtig ist. Möglicherweise kann die erstmalig beschriebene Trunkierung zu einer veränderten Affinität des Liganden-Rezeptor-Komplexes führen.

Wie wir in vorangegangenen Untersuchungen zeigen konnten, induziert rhTRAIL in humanen Nierenkarzinomzelllinien den apoptotischen Zelltod. Darüber hinaus konnte eine primäre TRAIL-Sensitivität durch gleichzeitige Applikation des Topoisomerasehemmers Topotecan (Hycamtin®) im Sinne eines synergistischen Effektes verstärkt werden. Die dafür verantwortlichen Mechanismen waren bislang nicht bekannt und wurden kontrovers diskutiert. Wir haben deshalb speziell die Rolle der IAP-Familie in diesem Zusammenhang überprüft. In der aus diesem Grund untersuchten Expression verschiedener IAP-Familienmitglieder konnte tatsächlich eine deutliche Abnahme der Expression von IAP-2 nach Topotecangabe nachgewiesen werden.

Insbesondere Survivin, ein weiteres Mitglied der IAP-Familie, hat vor kurzem durch seine selektive Re-expression in maligne transformiertem Gewebe besondere Aufmerksamkeit gewonnen. Zahlreiche Arbeiten konnten eine signifikante Korrelation zwischen schlechter Prognose unterschiedlicher maligner Tumortypen und einer gesteigerten Survivinexpression feststellen. Nach der Identifikation der beiden alternativen Spleißvarianten Survivin- Δ Ex3 und -2B mit unterschiedlichem antiapoptotischen Potential, sind wir der Frage nachgegangen, welche Bedeutung den verschiedenen Survivinvarianten für die Tumorprogression zukommt. Hierzu wurde die *in vivo*-Expression der Survivinvarianten im Magen- und Nierenzellkarzinom untersucht.

Sowohl im Magenkarzinom als auch im Nierenzellkarzinom konnte eine signifikante Abnahme der Expression von proapoptotischem Survivin-2B in fortgeschrittenen Tumorstadien beobachtet werden. Darüber hinaus wiesen die aggressiveren klarzelligen Nierenzellkarzinome eine signifikant höhere Expression der Survivinvarianten auf als chromophilzellig/papillär differenzierte Nierenzellkarzinome. Insbesondere die Abnahme von proapoptotischem Survivin-2B könnte während der Tumorprogression die Bereitschaft zum apoptotischen Zelltod herabsetzen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

ADIDA, C., BERREBI, D., PEUCHMAUR, M., REYES-MUGICA, M., ALTIERI, D.C. (1998): Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. – *Lancet* 351: 882-883

ADIDA, C., HAIOUN, C., GAULARD, P., LEPAGE, E., MOREL, P., BRIERE, J., DOMBRET, H., REYES, F., DIEBOLD, J., GISSELBRECHT, C., SALLES, G., ALTIERI, D.C., MOLINA, T.J. (2000): Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. – *Blood* 96: 1921-1925

AMBROSINI, G., ADIDA, C., ALTIERI, D.C. (1997): A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. – *Nat. Med.* 3: 917-921

ARAI, T., AKIYAMA, Y., OKABE, S., SAITO, K., IWAI, T., YUASA, Y. (1998): Genomic organization and mutation analyses of the DR5/TRAIL receptor 2 gene in colorectal carcinomas. – *Cancer Lett.* 133: 197-204

BALDINI, N. (1997): Multidrug resistance – a multiplex phenomenon. – *Nat. Med.* 3: 378-380

BALDWIN, A.S. JR. (1996): The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. – *Annu Rev Immunol.* 14: 649-683

BAEUERLE, P.A., BALTIMORE, D. (1988): I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. – *Science* 242: 540-546

BAEUERLE, P.A., BALTIMORE D. (1988): Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. – *Cell* 53: 211-217

BERNARDI, P. (1996): The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. – *Biochim. Biophys.* 1275: 5-9

BIRNBAUM, M.J., CLEM, R.J., MILLER, L.K. (1994): An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. – *J. Virol.* 68: 2521-2528

BODMER, J.L., MEIER, P., TSCHOPP, J., SCHNEIDER, P. (2000): Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. – *J. Biol. Chem.* 275: 20632-20637

BODMER, J.L., HOLLER, N., REYNARD, S., VINCIGUERRA, P., SCHNEIDER, P., JUO, P., BLENIS, J., TSCHOPP, J. (2000): TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. – *Nat. Cell Biol.* 2 :241-243

BOLDIN, M.P., GONCHAROV, T.M., GOLTSEV, Y.V., WALLACH, D. (1996): Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. – *Cell* 85: 803–815.

BORNER C, MONNEY L. (1999): Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? – *Cell Death Differ.* 6:497-507.

BRADFORD, M.M., (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins using the principle of protein-dye binding. – *Anal. Biochem.* 72: 248-254

CARSON, D.A., RIBEIRO, J.M. (1993): Apoptosis and disease. – *Lancet* 341: 1251-1254

CASCINO, I., FIUCCI, G., PAPOFF, G., RUBERTI, G. (1995): Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. – *J. Immunol.* 154: 2706-2713

CASCINO, I., PAPOFF, G., MARIA, D., TESTI, R., RUBERTI, G. (1996): Fas/Apo-1/CD95 receptor lacking the intracytoplasmic signaling domain protects tumor cells from Fas-mediated apoptosis. – *J. Immunol.* 156: 13

CHAUDHARY, P.M., EBY, M., JASMIN, A., BOOKWALTER, A., MURRAY, J., HOOD, L. (1997): Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF- κ B pathway. – *Immunity* 7: 821-830

CHERNYAK, B.V. (1997): Redox regulation of the mitochondrial permeability transition pore. – *Biosci. Rep.* 17: 293-302

CHINNAIYAN, A.M., PRASAD, U., SHANKAR, S., HAMSTRA, D.A., SHANAIAH, M., CHENEVERT, T.L., ROSS, B.D., REHEMTULLA, A. (2000): Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 1754-1759

CHOMZCZYNSKI, P., SACCHI, N. (1986): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. – *Anal. Biochem.* 162: 156-159

CHU, Z.L., MCKINSEY, T.A., LIU, L., GENTRY, J.J., MALIM, M.H., BALLARD, D.W. (1997): Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF- κ B control. – *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94: 10057-10062

CLARKE, A.R., PURDIE, C.A., HARRISON, D.J., MORRIS, R.G., BIRD, C.C., HOOPER, M., WYLLIE, A.H. (1993): Thymocytes apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. – *Nature* 362: 849-852

COHEN GM. (1997): Caspases: the executioners of apoptosis. – *Biochem. J.* 326: 1-16

COUSTAN-SMITH, E., KITANAKA, A., PUI, C.H., MCNINCH, L., EVANS, W.E., RAIMONDI, S.C., BEHM, F.G., ARICO, M., CAMPANA, D. (1996): Clinical relevance of BCL-2 overexpression in childhood acute lymphoblastic leukemia. – *Blood* 87: 1140-1146

- CROOK, N.E., CLEM, R.J., MILLER, L.K. (1993):** An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. – *J. Virol.* 67: 2168-2174
- DEGLI-ESPOSTI, M.A., SMOLAK, P.J., WALCZAK, H., WAUGH, J., HUANG, C-P., DUBOSE, R., GOODWIN, R.G., SMITH, C.A. (1997):** Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. – *J.Exp.Med.* 186: 1165-1170
- DEGLI-ESPOSTI, M.A., DOUGALL, W.C., SMOLAK, P.J., WAUGH, J.Y., SMITH, C.A., GOODWIN, R.G. (1997):** The novel receptor TRAIL-R4 induces NF- κ B and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. – *Immunity* 7: 813-820
- DEJOSEZ, M., RAMP, U., MAHOTKA, C., KRIEG, A., WALCZAK, H., GABBERT, H.E., GERHARZ, C.D. (2000):** Sensitivity to TRAIL/APO-2L-mediated apoptosis in human renal cell carcinomas and its enhancement by topotecan. *Cell Death Differ.* – 7: 1127-1136
- DEVERAUX, Q.L., TAKAHASHI, R., SALVESEN, G.S., REED, J.C. (1997):** X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. – *Nature* 388: 300-304
- DIDONATO, J.A., HAYAKAWA, M., ROTHWARF, D.M., ZANDI, E., KARIN, M. (1997):** A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. – *Nature* 388:548-554
- DIXON, M.F., GENTA, R.M., YARDLEY, J.H., CORREA, P. (1996):** Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International workshop on the histopathology of gastritis. – *Am. J. Surg. Pathol.* 10: 1161-1181
- DUCKETT, C.S., NAVA, V.E., GEDRICH, R.W., CLEM, R.J., VAN DONGEN, J.L., GILFILLAN, M.C., SHIELS, H., HARDWICK, J.M., THOMPSON, C.B. (1996):** A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. – *EMBO J.* 15: 2685-94
- DURIEZ, P.J., SHAH, G.M. (1997):** Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. – *Biochem. Cell Biol.* 75: 337-349
- FESUS, L. (1993):** Biochemical events in naturally occurring forms of cell death. – *FEBS Lett.* 328: 1-5
- FORD, J.M., HANAWALT, P.C. (1995):** Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription coupled repair and enhanced UV-resistance. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8875-8880
- FREEMONT, P.S. (1993):** The RING finger. A novel protein sequence motif related to the zinc finger. – *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 684: 174-192

GARCIA-MARTINEZ, V., MACIAS, D., GANAN, Y., GARCIA-LOBO, J.M., FRANCIA, M.V., FERNANDEZ-TERAN, M.A., HURLE, J.M. (1993): Internucleosomal DNA fragmentation and programmed cell death (apoptosis) in the interdigital tissue of the embryonic chick leg bud. – *J. Cell Sci.* 106: 201-208

GARNIER, J., OSGUTHORPE, D.J., ROBSON, B. (1978): Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. – *J. Mol. Biol.* 120: 97-120

GENTILE, V.T., PIACENTINI, M. (1992): Expression of tissue transglutaminase in balb-C 3T3 fibroblasts. – *J. Cell Biol.* 119: 463-474

GERHARZ, C.D., MOLL, R., STÖRKEL, S., RAMP, U., THOENES, W., GABBERT, H.E. (1993): Ultrastructural appearance and cytoskeletal architecture of the clear, chromophilic and chromophobe cell variants of human renal cell carcinoma in vivo and in vitro. – *Am. J. Pathol.* 142: 851-859

GERHARZ, C.D., RAMP, U., OLERT, J., MOLL, R., STÖRKEL, S., MARX, N., GABBERT, H.E. (1994): Cytomorphological cytogenetic and molecular biological characterization of four new human renal carcinoma cell lines of the clear cell type. – *Virch. Arch.* 424: 403-409

GERHARZ, C.D., MOLL, R., STÖRKEL, S., RAMP, U., HILDEBRANDT, B., MOLSBERGER, G., KOLDOVSKY, P., GABBERT, H.E. (1995): Establishment and characterization of two divergent cell lines derived from a human chromophobe renal cell carcinoma. – *Am. J. Pathol.* 146: 953-962

GERHARZ, C.D., HILDEBRANDT, B., MOLL, R., RAMP, U., SARBIA, M., STÖRKEL, S., KOLDOVSKY, P., GABBERT, H.E. (1996): Chromophilic renal cell carcinoma: cytomorphological and cytogenetic characterization of four permanent cell lines. – *Br. J. Cancer* 74: 1605-1614

GHOSH, S., MAY, M.J., KOPP, E.B. (1998): NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. – *Annu. Rev. Immunol.* 16: 225-260

GREEN D, KROEMER G. (1998): The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? – *Trends Cell Biol.* 8:267-71.

GRIFFITH, T.S., CHIN, W.A., JACKSON, G.C., LYNCH, D.H., KUBIN, M.Z. (1998): Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. – *J. Immunol.* 161: 2833-2840

HAUSER, H.P., BARDROFF, M., PYROWOLAKIS, G., JENTSCH, S. (1998): A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. – *J. Cell Biol.* 141: 1415-1422

HAY, B.A., WASSARMAN, D.A., RUBIN, G.M. (1995): Drosophila homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. – *Cell* 83: 1253-1262

HEATH, C.W. JR, LALLY, C.A., CALLE, E.E., MCLAUGHLIN, J.K., THUN, M.J. (1997): Hypertension, diuretics, and antihypertensive medications as possible risk factors for renal cell cancer. – *Am. J. Epidemiol.* 145: 607-613

VON HEIJNE ,G. (1986): A new method for predicting signal sequence cleavage sites. – *Nucleic Acids Res.* 14: 4683-4690

HERNANDEZ, A., MEYER, A., ENCZMANN, J., ACKERMANN, R., WERNET, P. (1999): Establishment of experimental conditions for the rapid detection of mutations in the von Hippel-Lindau gene by parallel temperature gradient gel electrophoresis. – *Electrophoresis* 20: 1958-1961

HERR, I., WILHELM, D., MEYER, E., JEREMIAS, I., ANGEL, P., DEBATIN, K.M. (1999): JNK/SAPK activity contributes to TRAIL-induced apoptosis. – *Cell Death Differ.* 6: 130-135

HIRSCH, T., MARZO, I., KROEMER, G. (1997): Role of the mitochondrial permeability transition pore in apoptosis. – *Biosci. Rep.* 17: 67-76

HOFMANN, K., BUCHER, P., TSCHOPP, J. (1997): The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. – *Trends Biochem. Sci.* 22: 155-6.

HORTON, P., NAKAI, K. (1997): Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. – *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 5: 147-152

IRMLER, M., THOME, M., HAHNE, M., SCHNEIDER, P., HOFMANN, K., STEINER, V., BODMER, J.L., SCHROTER, M., BURNS, K., MATTMANN, C., RIMOLDI, D., FRENCH, L.E., TSCHOPP, J. (1997): Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. – *Nature* 388: 190-195

JAMESON BA, WOLF H. (1988): The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. – *Comput. Appl. Biosci.* 4: 181-186

JAYSON, M., SANDERS, H. (1998): Increased incidence of serendipitously discovered renal cell carcinoma. – *Urology* 51: 203-205

JEREMIAS, I., KUPATT, C., BAUMANN, B., HERR, I., WIRTH, T., DEBATIN, K.M. (1998): Inhibition of nuclear factor kappaB activation attenuates apoptosis resistance in lymphoid cells. – *Blood* 91: 4624-4631

KASTAN, M.B., ONYEKWERE, O., SIDRANSKY, D., VOGELSTEIN, B., CRAIG, R. (1991): Participation of p53 protein in cellular response to DNA-damage. – *Cancer Res.* 6304-6311

KATO, J., KUWABARA, Y., MITANI, M., SHINODA, N., SATO, A., TOYAMA, T., MITSUI, A., NISHIWAKI, T., KALINSKI, T., JAQUET, K., LANGEN, R., WANG, L., GABBERT, H.E., GERHARZ, C.D. (1997): An optimized electroporation protocol for transfection of sensitive cell lines using basic laboratory equipment. – *Biotech. Tech.* 11: 717-722

KATO, J., KUWABARA, Y., MITANI, M., SHINODA, N., SATO, A., TOYAMA, T., MITSUI, A., NISHIWAKI, T., MORIYAMA, S., KUDO, J., FUJII, Y. (2001): Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. – *Int J Cancer* 95:92-95

KAWASAKI, T., BILIM, V., TAKAHASHI, K., TOMITA, Y. (1999): Infrequent alteration of p53 pathway in metastatic renal cell carcinoma. – *Oncol. Rep.* 6: 329-333

KAWASAKI, H., ALTIERI, D., LU, C.D., TOYODA, M., TENJO, T., TANIGAWA, N. (1998): Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. – *Cancer Res.* 58: 5071–5074

KEANE, M.M., ETTENBERG, S.A., NAU, M.M., RUSSELL, E.K., LIPKOWITZ, S. (1999): Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. – *Cancer Res.* 59: 734-741

KERR, J.F.R., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. – *Brit. J. Canc.* 26: 239-257

KLEIN, P., KANEHISA, M., DELISI, C. (1985): The detection and classification of membrane-spanning proteins. – *Biochim. Biophys. Acta* 815: 468-476

KOBAYASHI, K., HATANO, M., OTAKI, M., OGASAWARA, T., TOKUHISA, T. (1999): Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. – *Proc. Natl. Sci. USA* 96: 1457-1462

KORNACKER, M., VERNERIS, M.R., KORNACKER, B., SCHEFFOLD, C., NEGRIN, R.S. (2001): Survivin expression correlates with apoptosis resistance after lymphocyte activation and is found preferentially in memory T cells. – *Immunol. Lett.* 76: 169-173

KRIEG, A., KRIEG, T., WENZEL, M., SCHMITT, M., RAMP, U., FANG, B., GABBERT, H.E., GERHARZ, C.D., MAHOTKA, C. (2003): TRAIL-beta and TRAIL-alpha: Two novel splice variants of the human TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) without apoptotic potential. – *Br. J. Cancer* 88: 918-927.

KROEMER, G., ZAMZAMI, N., SUSIN, S.A. (1997): Mitochondrial control of apoptosis. – *Immunol. Today* 18: 44-51

KUERBITZ, S.J., PLUNKETT, B.S., WALSH, W.V., KASTAN, M.B. (1992): Wild-type p53 cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7491-7495

KYTE J, DOOLITTLE RF. (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. – *J. Mol. Biol.* 157: 105-132

LACASSE, E.C., BAIRD, S., KORNELUK, R.G., MACKENZIE, A.E. (1998): The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. – *Oncogene* 17: 3247-3259

LAEMMLI, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. – *Nature* 227: 680-685

LEE, S.H., SHIN, M.S., KIM, H.S., LEE, H.K., PARK, W.S., KIM, S.Y. LEE, J.H., HAN, S.Y., PARK, J.Y., OH, R.R., JANG, J.J., HAN, J.Y., LEE, J.Y., YOO, N.J. (1999): Alterations of the DR5/TRAIL receptor 2 gene in non-small cell lung cancers. – *Cancer Res.* 59: 5683-5686

LEVERKUS, M., NEUMANN, M., MENGLING, T., (2000): Regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in primary and transformed human keratinocytes. – *Cancer Res.* 60: 553-559

LI, F., AMBROSINI, G., CHU, E.Y., PIESCIA, J., TOGNIN, S., MARCHISIO, P.C., ALTIERI, D.C. (1998): Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. – *Nature* 396: 580–583

LI, F., ACKERMANN, E.J., BENNET, C.F., ROTHERMEL, A.L., PLESCIA, J., TOGNIN, S., VILLA, A., MARCHISIO, P.C., ALTIERI, D.C. (1999): Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. – *Nat. Cell Biol.* 1: 461–466

LISTON, P., ROY, N., TAMAI, K., LEFEBVRE, C., BAIRD, S., CHERTON-HORVAT, G., FARAHANI, R., MCLEAN, M., IKEDA, J.E., MACKENZIE, A., KORNELUK, R.G. (1996): Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. – *Nature* 379: 349-53

LORENZO HK, SUSIN SA, PENNINGER J, KROEMER G. (1999): Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. – *Cell Death Differ.* 1999 6:516-24.

LOWE, S.W., SCHMITT, E.M., SMITH, S.W., OSBORNE, B.A, JACKS, T. (1993): p53 required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. – *Nature:* 847-849

LU, C.D., ALTIERI, D.C., TANIGAWA, N. (1998): Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. – *Cancer Res.*58: 1808-1812

MACFARLANE, M., AHMAD, M., SRINIVASULA, S.M., FERNANDES-ALNEMRI, T., COHEN, G.M., ALNEMRI, E.S. (1997): Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. – *J.Immunol.* 272: 25417-25420

MAHOTKA, C., WENZEL, M., SPRINGER, E., GABBERT, H.E., GERHARZ, C.D. (1999): Survivin- Δ Ex3 and Survivin-2B: Two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different anti-apoptotic properties. – *Cancer Res.* 59: 6097-6102

MANJI, G.A., HOZAK, R.R., LACOUNT, D.J., FRIESEN, P.D. (1997): Baculovirus inhibitor of apoptosis functions at or upstream of the apoptotic suppressor P35 to prevent programmed cell death. – *J. Virol.* 71: 4509-4516

MARSTERS, S.A., SHERIDAN, J.P., PITTI, R.M., HUANG, A., SKUBATCH, M., BALDWIN, D., YUAN, J., GURNEY, A., GODDARD, A.D., GODOWSKI, P., ASHKENAZI, A. (1997): A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. – *Curr.Biol.* 7: 1003-1006

MATTSON, M.P. (2000): Apoptosis in neurodegenerative disorders. – *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1: 120-129

MAY, M.J., GHOSH, S. (1997): Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. – *Semin. Cancer Biol.* 8: 63-73

MENG, R.D., MCDONALD, E.R., SHEIKH, M.S. (2000): The TRAIL decoy receptor TRUND (DcR2, TRAIL-R4) is induced by adenovirus-p53 overexpression and can delay TRAIL-, p53-, and KILLER/DR5-dependent colon cancer apoptosis. – *Mol. Ther.* 1: 130-144

MERCURIO, F., ZHU, H., MURRAY, B.W., SHEVCHENKO, A., BENNETT, B.L., LI, J., YOUNG, D.B., BARBOSA, M., MANN, M., MANNING, A., RAO, A. (1997): IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. – *Science* 31; 278: 860-866

MONGKOLSAPAYA, J., GRIMES, J.M., CHEN, N., XU, X.N., STUART, D.I., JONES, E.Y., SCREATON, G.R. (1999): Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation. – *Nat Struct Biol.* 6:1048-1053

MONZO, M., ROSELL, R., FELIP, E., ASTUDILLO, J., SANCHEZ, J.J., MAESTRE, J., MARTIN, C., FONT, A., BARNADAS, A., ABAD, A. (1999): A novel anti-apoptosis gene: re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small cell lung cancers. – *J. Clin. Oncol.* 17: 2100-2104

MORIYAMA, S., KUDO, J., FUJII, Y. (2001): Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. – *Int. J. Cancer* 95: 92-95

MOUNT, S.M. (1982): A catalogue of splice junction sequences. – *Nucleic Acids Research* 10: 459-472

MULDERS, P., FIGLIN, R., DEKERNION, J.B., WILTROUT, R., LINEHAN, M., PARKINSON, D., DEWOLF, W., BELLDEGRUN, A. (1997): Renal cell carcinoma: recent progress and future directions. – *Cancer Res.* 57: 5189-5195

MÜHLENBECK, F., HAAS, E., SCHWENZER, R., SCHUBERT, G., GRELL, M., SMITH, C., SCHEURICH, P., WAJANT, H. (1998): TRAIL/Apo2L activates c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) via caspase-dependent and caspase-independent pathways. – *J. Biol. Chem.* 273: 33091-33098

MULLER, M., WILDER, S., BANNASCH, D., ISRAELI, D., LEHLBACH, K., LI-WEBER, M., FRIEDMAN, S.L., GALLE, P.R., STREMMEL, W., OREN, M., KRAMMER, P.H. (1998): p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. – *J. Exp. Med* 188: 2033-2045

MULLIS, K., FALOONA, F. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. – *Meth. Enzymol.* 55: 335-350

NATARAJAN, K., SINGH, S., BURKE, T.R. JR, GRUNBERGER D., AGGARWAL, B.B. (1996): Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 9090-9095

NEGRIER, S., ESCUDIER, B., LASSET, C., DOUILLARD, J.Y., SAVARY, J., CHEVREAU, C. (1998): Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa 2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. – *N. Engl. J. Med.* 338: 1272-1278

NEUMANN, H.P., BENDER, B.U., BERGER, D.P., LAUBENBERGER, J., SCHULTZE-SEEMANN, W., WETTERAUER, U. (1998): Prevalence, morphology and biology of renal cell carcinoma in the von Hippel-Lindau disease compared to sporadic renal cell carcinoma. – *J. Urology* 160: 1248-1254

NISHIKAWA, K., OOI, T. (1986): Amino acid sequence homology applied to the prediction of protein secondary structures, and joint prediction with existing methods. – *Biochim. Biophys. Acta* 871: 45-54

NOLAN, G.P., GHOSH, S., LIU, H.C., TEMPST, P., BALTIMORE, D. (1991): DNA binding and I kappa B inhibition of the cloned p65 subunit of NF-kappa B, a rel-related polypeptide. – *Cell* 64: 961-969

O'REILLY LA, STRASSER A. (1999): Apoptosis and autoimmune disease. – *Inflamm Res.* 48:5-21. Review.

PAN, G., NI, J., YU, G-L., WEI, Y-F., DIXIT, V.M. (1998): TRUND, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling. – *FEBS Lett.* 424: 41-45

- PAN, G., NI, J., YU, G-L., WEI, Y-F., GENTZ, R., DIXIT, V.M. (1997): An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. – *Science* 277: 815-818
- PITTI, R.M., MARSTERS, S.A., RUPPERT, S., DONAHUE, C.J., MOORE, A., ASHKENAZI, A. (1996): Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. – *J. Biol. Chem.* 271: 12687-12690
- RATHMELL, J.C., COOKE, M.P., HO, W.Y., GREIN, J., TOWNSEND, S.E., DAVIS, M.M., GOODNOW, C.C. (1995): CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4+ T cells. – *Nature* 376: 181-184
- REGNIER, C.H., SONG, H.Y., GAO, X., GOEDDEL, D.V., CAO, Z., ROTHE, M. (1997): Identification and characterization of an IkappaB kinase. – *Cell*. 90: 373-383
- RIEGER, J., OHGAKI, H., KLEIHUES, P., WELLER, M. (1999): Human astrocytic brain tumors express Apo2L/TRAIL. – *Acta Neuropathol.* 97: 1-4
- ROSHAL, M., ZHU, Y., PLANELLES, V. (2001): Apoptosis in AIDS. – *Apoptosis* 6: 103-116
- ROTHER, M., PAN, M.G., HENZEL, W.J., AYRES, T.M., GOEDDEL, D.V. (1999): The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. – *Cell* 83: 1243-1252
- ROTONDA, J., GARCIA-CALVO, M., BULL, H.G., GEISLER, W.M., MCKEEVER, B.M., WILLOUGHBY, C.A., THORNBERRY, N.A., BECKER, J.W. (2001): The three-dimensional structure of human granzyme B compared to caspase-3, key mediators of cell death with cleavage specificity for aspartic acid in P1. – *Chem. Biol.* 8: 357-368
- ROY, N., DEVERAUX, Q.L., TAKAHASHI, R., SALVESEN, G.S., REED, J.C. (1997): The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. – *EMBO J.* 16: 6914-6925
- RUBERTI, G., CASCINO, I., PAPOFF, G., ERAMO, A. (1996): Fas splicing, variants and their effect on apoptosis. – *Adv. Exp. Med. Biol.* 406: 125-134
- RUPEC, R.A., BAEUERLE, P.A. (1995): The genomic response of tumor cells to hypoxia and reoxygenation. Differential activation of transcription factors AP-1 and NF-kappa B. – *Eur. J. Biochem.* 234: 632-640
- SAMBRANO, G., STEINBERG, D. (1995): Recognition of oxidatively damaged and apoptotic cells by an oxidized low density lipoprotein receptor on mouse peritoneal macrophages. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1396-1400
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5436-5467

SANNA, M.G., DUCKETT, C.S., RICHTER, B.W., THOMPSON, C.B., ULEVITCH, R.J. (1998): Selective activation of JNK1 is necessary for the anti-apoptotic activity of hILP. – *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 6015-6020

SARELA, A.I., MACADAM, R.C., FARMERY, S.M., MARKHAM, A.F., GUILLOU, P.J. (2000): Expression of the antiapoptosis gene, Survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. – *Gut* 46: 645–650

SHELTEMA JM, ROMIJN JC, VAN STEENBRUGGE GJ, SCHRODER FH, MICKISCH GH. (2001): Inhibition of apoptotic proteins causes multidrug resistance in renal carcinoma cells. – *Anticancer Res.* 21:3161-6.

SCHOENFELD AR, PARRIS T, EISENBERGER A, DAVIDOWITZ EJ, DE LEON M, TALASAZAN F, DEVARAJAN P, BURK RD. (2000): The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene protects cells from UV-mediated apoptosis. – *Oncogene.* 19:5851-7.

SCHNEIDER, P., THOME, M., BURNS, K., BODMER, J.L., HOFMANN, K., KATAOKA, T., HOLLER, N., TSCHOPP, J. (1997): TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF- κ B. – *Immunity* 7: 831-836

SCHULZE-OSTHOFF, K., FERRARI, D., LOS, M., WESSELBORG, S., PETER, M.E. (1998): Apoptosis signaling by death receptors. – *Eur. J. Biochem.* 254: 439-459

SCREATON, G.R., MONGKOLSAPAYA, J., XU, X.N., COWPER, A.E., MCMICHAEL, A.J., BELL, J.I. (1997): TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. – *Curr. Biol.* 7: 693-696

SELLIAH, N., FINKEL, T.H. (2001): Biochemical mechanisms of HIV induced T cell apoptosis. – *Cell Death Differ.* 8: 127-136

SEN, R., BALTIMORE, D. (1986): Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. – *Cell.* 46: 705-716

SEOL, D.W., BILLIAR, T.R. (2000): Cysteine 230 modulates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand activity. – *Cancer Res.* 60: 3152-3154

SHEIKH, M.S., BURNS, T.F., HUANG, Y., WU, G.S., AMUNDSON, S., BROOKS, K.S., FORNACE JR, A.J., EL-DEIRY, W.S. (1998): p53-dependent and -independent regulation of the death receptor KILLER/DR5 gene expression in response to genotoxic stress and tumor necrosis factor alpha. – *Cancer Res.* 58: 1593-1598

SHEIKH, M.S., HUANG, Y., FERNANDEZ-SALAS, E.A. (1999): The antiapoptotic decoy receptor TRID/TRAIL-R3 is a p53-regulated DNA damage-inducible gene that is overexpressed in primary tumors of the gastrointestinal tract. – *Oncogene* 18: 4153-4159

SHERIDAN, J.P., MARSTERS, S.A., PITTI, R.M., GURNEY, A., SKUBATCH, M., BALDWIN, D., RAMAKRISHNAN, L., GRAY, C.L., BAKER, K., WOOD, W.I., GODDARD, A.D., GODOWSKI, P., ASHKENAZI, A. (1997): Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. – *Science* 277: 818-821

SLEE, E.A., HARTE, M.T., KLUCK, R.M., WOLF, B.B., CASIANO, C.A., NEWMAYER, D.D., WANG, H.G., REED, J.C., NICHOLSON, D.W., ALNEMRI, E.S., GREEN, D.R., MARTIN, S.J. (1999): Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. – *J. Cell Biol.* 144: 281-292

SMITH, M.L., CHEN, I.T., ZHAN, Q., O'CONNOR, P.M., FORNACE, A.J. (1995): Involvement of the p53 tumor suppressor in the repair of UV-type DANN damage. – *Oncogene* 10: 1053-1059

SOBIN, L.H., WITTEKIND, C.H. (EDS.): TNM classification of malignant tumors. – Wiley-Liss New York
Chickerten Weinheim 1997 (5th edition)

STADEN, R. (1984): Computer methods to locate signals in nucleic acid sequences. – *Nucleic Acids Research* 12: 505-519

STEHLIK, C., DE MARTIN, R., KUMABASHIRI, I., SCHMID, J.A., BINDER, B.R., LIPP, J. (1998): Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. – *J. Exp. Med.* 188: 211-216

SUSIN, S.A., LORENZO, H.K., ZAMZAMI, N., MARZO, I., BRENNER, C., LAROCLETTE, N., PREVOST, M.C., ALZARI, P.M., KROEMER, G. (1999): Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. – *J. Exp. Med.* 189: 381-394

SUSIN, S.A., LORENZO, H.K., ZAMZAMI, N., MARZO, I., SNOW, B.E., BROTHERS, G.M., MANGION, J., JACOTOT, E., COSTANTINI, P., LOEFFLER, M., LAROCLETTE, N., GOODLETT, D.R., AEBERSOLD, R., SIDEROVSKI, D.P., PENNINGER, J.M., KROEMER, G. (1999): Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. – *Nature* 397: 441-446

SUZUKI A, TSUTOMI Y, AKAHANE K, ARAKI T, MIURA M. (1998): Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. – *Oncogene* 17: 931-939

SWANA, H.S., GROSSMAN, D., ANTHONY, J.N., WEISS, R.M., ALTIERI, D.C. (1999): Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N. Engl. J. Med.* 341: 452–453

TAMM, I., WANG, Y., SAUSVILLE, E., SCUDIERO, D.A., VIGNA, N., OTTERSDFORF, T., REED, J.C. (1998): IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by fas (CD95), bax, caspases, and anticancer drugs. – *Cancer Res.* 58: 5315–5320

TAKAHASHI, R., DEVERAUX, Q., TAMM, I., WELSH, K., ASSA-MUNT, N., SALVESEN, G.S., REED, J.C. (1998): A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. – *J. Biol. Chem.* 273: 7787-7790

THOENES, W., STORKEL, S., RUMPELT, H.J. (1986): Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics. – *Pathol. Res. Pract.* 181: 125-143

THOMPSON, C.B. (1995): Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. – *Science* 267: 1456-1462

THORNBERRY, N.A., LAZEBNIK, Y. (1998): Caspases: enemies within. – *Science* 281: 1312-1316

TORRES, V.E., ZINCKE, H., KING, B.K., BJORNSSON, J. (1997): Renal manifestation of tuberous sclerosis complex. – *Contrib. Nephrol.* 122: 64-75

TRABZUNI, D., FAMULSKI, K.S., AHMAD, M. (2000): Functional analysis of tumour necrosis factor- α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): cysteine-230 plays a critical role in homotrimerization and biological activity of this novel tumoricidal cytokine. – *Biochem. J.* 350: 505-510

VAN DEN BERG, E., VAN DER HOUT, A.H., OOSTERHUIS, J.W., STORKEL, S., DIJKHUIZEN, T., DAM, A., ZWEERS, H.M., MENSINK, H.J., BUYS, C.H., DE JONG, B. (1993): Cytogenetic analysis of epithelial renal-cell tumors: relationship with a new histopathological classification. – *Int J Cancer* 55:223-227

VANDER HEIDEN, M.G., CHANDEL, N.S., WILLIAMSON, E.K., SCHUMACKER, P.T., THOMPSON, C.B. (1997): Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. – *Cell* 91: 627-637

VERMA, I.M., STEVENSON, J.K., SCHWARZ, E.M., VAN ANTWERP, D., MIYAMOTO, S. (1995): Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. – *Genes Dev.* 9: 2723-2735

WAJANT, H., JOHANNES, F.J., HAAS, E., SIEMIENSKI, K., SCHWENZER, R., SCHUBERT, G., WEISS, T., GRELL, M., SCHEURICH, P. (1998): Dominant-negative FADD inhibits TNFR60-, Fas/Apo1- and TRAIL-R/Apo2-mediated cell death but not gene induction. – *Curr. Biol.* 8: 113-116

WALCZAK, H., DEGLI-ESPOSTI, M.A., JOHNSON, R.S., SMOLAK, P.J., WAUGH, J.Y., BOIANI, N., TIMOUR, M.S., GERHART, M.J., SCHOOLEY, K.A., SMITH, C.A., GOODWIN, R.G., RAUCH, C.T. (1997): TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. – EMBO J. 16: 5386-5397

WALCZAK, H., MILLER, R.E., ARIAIL, K., GLINIAK, B., GRIFFITH, T.S. (1999): Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. – Nat. Med. 5: 157-163

WANG, X.W., YEH, H., SCHAEFFER, L., ROY, R., MONCOLLIN, V., EGLY, J.M., WANG, FREIDBERG, E.C., EVANS, M.K., TAFFE, B.G., BOHR, V.A., WEEDA, G., HOEJMAN, J.H.J., FORRESTER, K., HARRIS, C.C. (1995): p53 modulation of TFIID-associated nucleotide excision repair activity. – Nat. Genet. 10: 188-195

WANG, C.Y., MAYO, M.W., KORNELUK, R.G., GOEDEL, D.V., BALDWIN, A.S. JR. (1998): NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. – Science 281: 1680-1683

WATANABE, H., JASS, J.R., SOBIN, L.H.: Histological typing of oesophageal and gastric tumours. WHO International classification of tumors. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 1998 (2nd edition)

WENZEL, M., MAHOTKA, C., KRIEG, A., BACHMANN A., SCHMITT, M., GABBERT, H.E., GERHARTZ, C.D. (2000): Novel survivin-related members of the inhibitor of apoptosis (IAP) family. – CELL DEATH DIFFER. 7: 682-683

WILSON, K.P., BLACK, J.A., THOMSON, J.A., KIM, E.E., GRIFFITH, J.P., NAVIA, M.A., MURCKO, M.A., CHAMBERS, S.P., ALDAPE, R.A., RAYBUCK, S.A., ET AL. (1994): Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. – Nature 370: 270-275

WORONICZ, J.D., GAO, X., CAO, Z., ROTHE, M., GOEDEL, D.V. (1997): IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK. – Science 278: 866-869

WU, G.S., BURNS, T.F., McDONALD, E.R. (1997): KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. – Nature Genet. 17: 141-143

WU, G.S. , BURNS, T.F., McDONALD, E.R. (1999): Induction of the TRAIL receptor KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis but not growth arrest. – Oncogene 18: 6411-6418

YU, J., ZHANG, L., HWANG, P.M., RAGO, C., KINZLER, K.W., VOGELSTEIN, B. (1999): Identification and classification of p53-regulated genes. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 14517-14522

YUAN, J.M., CASTELAO, J.E., GAGO-DOMINGUEZ, M., ROSS, R.K., YU, M.C. (1998): Hypertension, obesity and their medications in relation to renal cell carcinoma. – Br. J. Cancer 77: 1508-1513

YUAN, J.M., CASTELAO, J.E., GAGO-DOMINGUEZ, M., YU, M.C., ROSS, R.K. (1998): Tobacco use in relation to renal cell carcinoma. – *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7: 429-433

ZHANG, X.D., FRANCO, A., MYERS, K., GRAY, C., NGUYEN, T., HERSEY, P. (1999): Relation of TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. – *Cancer Res.* 59: 2747-2753

ZORATTI, M., SZABO, I. (1995): The mitochondrial permeability transition. – *Biochim. Biophys. Acta.* 1241: 139-176

DANKSAGUNG

Herrn Prof. CLAUS DIETER GERHARZ möchte ich herzlich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, Betreuung und Vergabe des Themas danken. Insbesondere gilt mein Dank seiner Diskussionsbereitschaft, Aufgeschlossenheit und Anregung für meine Forschung als auch seiner wissenschaftlichen Förderung.

Herrn Prof. HELMUT ERICH GABBERT danke ich für die freundliche Aufnahme in sein Institut.

Herrn Prof. WOLFGANG SCHULZ danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Dr. rer. nat. CSABA MAHOTKA möchte ich für seine aufopferungsvolle wissenschaftliche Betreuung insbesondere bei methodischen Fragen und experimentellen Ansätzen danken.

Meinem Bruder Herrn Dipl. Biol. THOMAS KRIEG und meinem Freund Herrn Dr. rer. nat. MICHAEL WENZEL möchte ich für ihre Diskussionsbereitschaft und Zusammenarbeit bei gemeinsamen Projekten und Publikationen danken.

Herrn Dr. MARKUS SCHMITT möchte ich für die Unterstützung bei der Durchführung der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie danken.

Herrn Dr. rer. nat. MANFRED HEYDTHAUSEN danke ich für die Instruktion und Unterstützung bei den statistischen Auswertungen.

Meinen Eltern Herrn Priv.-Doz. Dr. HORST HEINRICH KRIEG und Frau ANNETTE KRIEG danke ich ganz besonders für ihre jahrelange finanzielle und geistige Unterstützung. Sie förderten mein Studium, meine wissenschaftlichen Ziele und die zahlreichen Kongressteilnahmen. Meinem Vater danke ich ganz besonders für seine Empfehlungen die vorbildhaft meinen ärztlichen Werdegang als Chirurg beeinflussen und für das Korrekturlesen des Manuskripts.

Meiner Freundin YVONNE RADERMACHER gilt mein Dank, die mir sowohl in den Korrekturphasen der Arbeit als auch beruflich ein liebevoller und verständnisvoller Rückhalt war.

Ich wünsche mir, daß durch diese Arbeit ein Baustein geschaffen wurde, der das biologische Verhalten maligner Tumoren weiter charakterisieren konnte und zur Entwicklung neuer Strategien in der Bekämpfung und Erkennung von Tumorerkrankungen beitragen kann.

CURRICULUM VITAE

Am 18.08.1974 bin ich, Andreas Krieg, in Mainz geboren. Meine Eltern sind Priv.-Doz. Dr. med. Horst Krieg und Annette Krieg geb. Schmidt.

1981 wurde ich in die katholische Grundschule in St. Tönis eingeschult und wechselte 1982 zur städtischen Gemeinschaftsgrundschule Krefeld-Forstwald. Diese verließ ich 1985 um das Fichte-Gymnasium in Krefeld zu besuchen. Ab 1991 setzte ich meine Schulausbildung am Gymnasium Horkesgath in Krefeld fort, an dem ich schließlich 1994 meine allgemeine Hochschulreife erlangen konnte. Von 1994 bis 1995 absolvierte ich als Rettungshelfer den Zivildienst beim Malteser Hilfsdienst in Krefeld. 1995 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf auf und konnte im September 1997 die ärztliche Vorprüfung erfolgreich bestehen. Nach abgeschlossenem erstem und zweitem Abschnitt der ärztlichen Prüfung, folgte im Mai 2002 der dritte Abschnitt der ärztlichen Prüfung und damit der Abschluß des Studiums an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf. Im Juli 2002 begann ich meine chirurgische Ausbildung als Arzt im Praktikum in der Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie an der Universitätsklinik Münster. Nach Erhalten der Approbation als Arzt, im Januar 2004, begann ich im Juni 2004 meine ärztliche Weiterbildung an der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W.T. Knoefel).

Das Thema meiner Dissertation erhielt ich während des ersten klinischen Semesters von Herrn Prof. Dr. med. C.D. Gerharz.

ABSTRACT

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des TRAIL-Systems in humanen Nierenkarzinomzelllinien untersucht. Dabei konnten erstmals zwei bislang unbekannte alternative TRAIL-Spleißvarianten identifiziert und charakterisiert werden. In der TRAIL- β -Isoform führt die Prozessierung des Exon 3 zur Translation eines trunkierten 98 Aminosäuren umfassenden Proteins mit Verlust der extrazellulären Domäne. Die zusätzliche Prozessierung von Exon 2 führt zur Generation der TRAIL- γ -Variante mit 52 Aminosäuren und nahezu kompletter Trunkierung der extrazellulären Bindedomäne. Durch den Verlust der extrazellulären Domäne dieser TRAIL-Varianten, die für die Signalinduktion durch Rezeptorbindung essentiell erscheint, ist eine apoptotische Wirkung sehr fraglich. Während TRAIL- α und - β eine zytoplasmatische Lokalisation aufweisen, zeigte TRAIL- γ eine membranäre, perinukleäre sowie endoplasmatische Akkumulation.

Daneben konnte eine bislang nicht identifizierte Spleißvariante des TRAIL-Rezeptors vom Typ 4 entdeckt werden. Diese Form weist eine Trunkierung der cysteinreichen Domäne 1 auf, die für die Liganden-Rezeptor-Interaktion wichtig ist. Möglicherweise kann dies zu einer veränderten Affinität des Liganden-Rezeptor-Komplexes führen.

Wie bereits gezeigt werden konnte, induziert rhTRAIL in humanen Nierenkarzinomzelllinien den apoptotischen Zelltod. Ferner konnte eine primäre TRAIL-Sensitivität durch gleichzeitige Applikation des Topoisomerasehemmers Topotecan (Hycamtin®) verstärkt werden. Die dafür verantwortlichen Mechanismen waren bislang nicht bekannt. Deshalb wurde speziell die Rolle der IAP-Familie in diesem Zusammenhang überprüft. Dabei konnte tatsächlich eine deutliche Abnahme der Expression von IAP-2 nach Topotecangabe nachgewiesen werden.

Survivin, ein weiteres Mitglied der IAP-Familie, hat vor kurzem durch seine selektive Re-expression in maligne transformiertem Gewebe besondere Aufmerksamkeit gewonnen. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen schlechter Prognose unterschiedlicher maligner Tumortypen und einer gesteigerten Survivinexpression festgestellt werden. Nach der Identifikation der Spleißvarianten Survivin- Δ Ex3 und -2B mit unterschiedlichem antiapoptotischen Potential, wurde die *in vivo*-Expression der Survivinvarianten im Magen- und Nierenzellkarzinom untersucht. Im Magen- und Nierenzellkarzinom konnte eine signifikante Abnahme der Expression von proapoptotischem Survivin-2B in fortgeschrittenen Tumorstadien beobachtet werden. Die aggressiveren klarzelligen Nierenzellkarzinome wiesen eine signifikant höhere Expression der Survivinvarianten auf als chromophilzellig/papillär differenzierte Nierenzellkarzinome. Die Abnahme von proapoptotischem Survivin-2B könnte während der Tumorprogression die Bereitschaft zum apoptotischen Zelltod herabsenken.